



Rôle des protéines de régulation du pH intracellulaire et du métabolisme énergétique dans les carcinomes du sein triple négatif

Jérôme Doyen

► To cite this version:

Jérôme Doyen. Rôle des protéines de régulation du pH intracellulaire et du métabolisme énergétique dans les carcinomes du sein triple négatif. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4147 . tel-01124296

HAL Id: tel-01124296

<https://theses.hal.science/tel-01124296>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS
UFR SCIENCES

Ecole doctorale des sciences de la Vie et de la santé
Doctorat de Recherche clinique et thérapeutique

**Rôle des protéines de régulation du
pH intracellulaire et du métabolisme
énergétique dans les carcinomes du sein
"triple négatif"**

Jérôme Doyen

Thèse soutenue publiquement le 20 décembre 2013,
Centre Antoine-Lacassagne amphithéâtre Jean Médecin 14h00,
pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Jury composé de :

- Pr Florence PEDEUTOUR	Présidente
- Pr Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET	Rapportrice
- Pr Anthony GONCALVES	Rapporteur
- Dr Francette ETTORE	Membre invitée
- Dr Jacques POUYSSEGUR	Directeur de thèse

SOMMAIRE:

Abbréviations.....	p.4
1. Altération du métabolisme énergétique dans les cancers	p.5
1.1. Introduction	p.5
1.2. Les anhydrases carboniques	p.8
1.3. Les transporteurs de monocarboxylates	p.10
1.4. Autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique des cancers: HIF-1, c-Myc, LAT-1	p.12
1.4.1 HIF	p.12
1.4.2. C-Myc	p.14
1.4.3. LAT-1	p.16
2. Les cancers du sein triple négatif	p.17
2.1. Définition	p.17
2.2. Caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires des cancers triple négatifs	p.18
2.3. Prise en charge actuelle des cancers du sein triple négatif	p.19
2.3.1. Traitement locorégional	p.19
2.3.2. Traitement adjuvant par chimiothérapie	p.20
2.3.3 Traitement des cancers du sein TNEG métastatiques	p.20
2.4. Le métabolisme glycolytique comme nouvelle cible thérapeutique dans les cancers du sein triple négatif ?	p.21
2.4.1. Données du PET-scanner au ¹⁸ -FDG	p.21
2.4.2. Résultats de la thèse du Dr Trastour (2011)	p.22
2.5. Hypothèses scientifiques	p.31
3. Matériel et méthodes	p.32
3.1. Partie clinique	p.32
3.1.1. Critères d'inclusion	p.32
3.1.2. Caractéristiques de la population et des traitements	p.32
3.1.3. Immunohistochimie et tissu-micro-array (TMA)	p.34
3.1.4 Statistiques	p.37

3.2. Partie fondamentale	p.38
3.2.1. Culture cellulaire et exposition à l'hypoxie	p.38
3.2.2. Détermination du statut hormonal et Her-2 des lignées tumorales	p.38
3.2.3. Mesure de la consommation en oxygène et de la production de protons	p.39
3.2.4. Délétion de MCT4 par technique des Zinc Finger Nucléases	p.40
3.2.4. Western blot	p.40
3.2.5. Clonogénicité	p.41
4. Résultats	p.42
4.1. Partie clinique	p.42
4.1.1. Marqueurs glycolytiques dans les cancers TNEG	p.42
4.1.2. Survies et facteurs pronostiques de SSRM et de SP	p.52
4.2. Partie fondamentale	p.56
4.2.1. Détermination du statut hormonal et Her-2 des lignées de cancer du sein	p.56
4.2.2. In vitro les lignées TNEG sont plus glycolytiques que les lignées RH+	p.57
4.2.3. L'inhibition seule de MCT1 sur les lignées TNEG n'a peu ou pas d'impact antiprolifératif	p.61
4.2.4. La sous-expression de MCT4 est associée à une réduction de la prolifération des cellules TNEG Hs578t	p.64
4.2.5. L'inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire permet de réduire la prolifération des lignées TNEG in vitro	p.69
5. Discussion	p.72
6. Conclusion	p.79
7. Bibliographie	p.80
8. Travaux annexes	p.85
8.1. Article 1: Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis	p.85
8.2. Article 2: miR-210 promotes a pseudohypoxic phenotype and increases tumor radioresistance in human lung cancer cell line A549	p.96

Abbreviations

GLUT1 = glucose transporter 1

¹⁸FDG = 18 fluor deoxy glucose

CA = carbonic anhydrase

LDH = lactate déshydrogénase

MCT = monocarboxylate transporteur

EMMPRIN = extracellular matrix metalloproteinase inducer (= basigine = CD147)

HIF-1 = hypoxia inducible factor 1

PHD = prolyl hydroxylase

ODDD = domaine de dégradation dépendant de l'oxygène

N-TAD = zone d'activation transcriptionnelle amino-terminale de HIF-1

C-TAD = zone d'activation transcriptionnelle carboxy-terminale de HIF-1

VHL = von Hippel Lindau

FIH = factor inhibiting HIF-1

BNIP3 = BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3

BNIP3L = BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3 ligand

VEGF = vascular epithelial growth factor

ANG2 = angiopoïétine 2

HK2 = hexokinase 2

PGK1 = Phosphoglycerate kinase 1

PDK1 = pyruvate déshydrogénase kinase 1

PI3K = Phosphatidylinositide 3-kinase

mTOR = mammalian target of rapamycin

ING4 = Inhibitor of growth protein 4

PTEN = Phosphatase and tensin homolog

PFKM = 6-phosphofructokinase, type musculaire

ENO1 = enolase 1

GLS = glutaminase

LAT-1 = L-type amino acid transporter 1

ERK = Extracellular signal-regulated kinases

ETC = electron transport chain

AMPK = AMP-activated protein kinase

mTORC1 = mammalian target of rapamycin complex 1
TNEG = cancer du sein triple négatif
IRM = imagerie par résonance magnétique
SBR = grade de scarf bloom et richardson modifié Elston et Ellis
CK = cytokératine
RB1 = rétinoblastome 1
EGFR = epidermal growth factor
IDH1 = Isocitrate dehydrogenase 1
AR = androgen receptor
RH = récepteur hormonal
SUV = standardized uptake value
SSRM = survie sans récurrence métastatique
SP = survie spécifique
SSR = survie sans rechute
SSRL = survie sans rechute locale
NA = non applicable
FEC = 5-FU, épirubicine, cyclophosphamide
TMA = tissu-micro array
HES = hématoxyline eosine safran
HR = Hazard Ratio
ZFN = zinc finger nuclease
miR-210 = micro ARN 210

1. Altération du métabolisme énergétique dans les cancers

1.1. Introduction

Les cancers se caractérisent par une prolifération cellulaire incontrôlée et continue, avec pour conséquence une demande énergétique et en nutriments supérieure à celle des cellules normales. Les anomalies du métabolisme énergétique ont ainsi récemment été considérées comme un nouveau "hallmark" émergent, potentiellement nécessaire à l'émergence de cancers (Figure 1 hallmark) ¹.

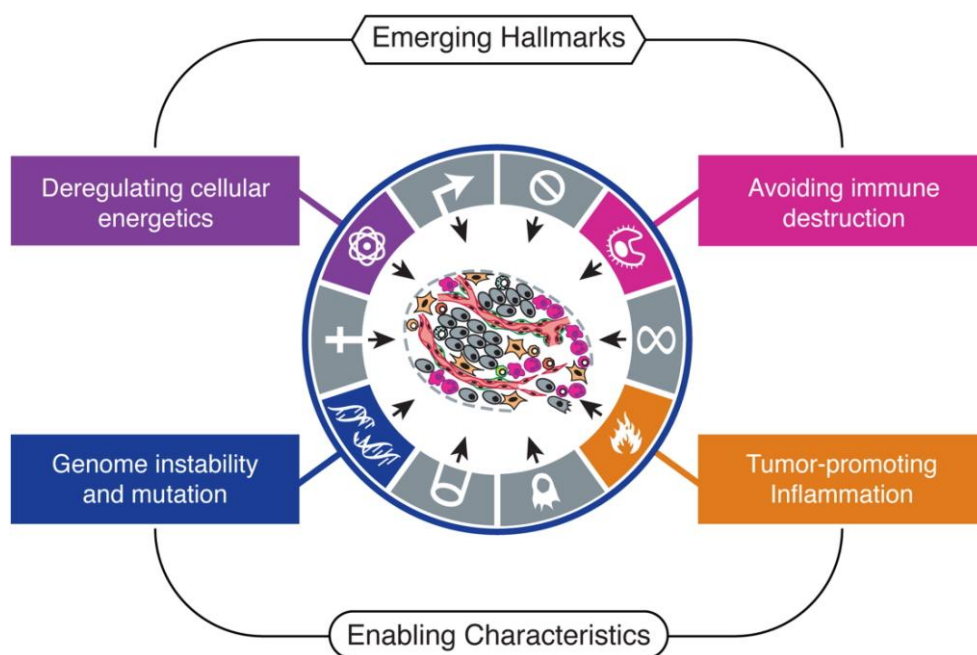


Figure 1. "Hallmarks" émergents (Hanahan D et Weinberg R, Cell 2011) : en complément des hallmarks déjà décrits et validés (résistance à l'apoptose, autosuffisance en facteur de croissance ...) 2 nouveaux hallmarks sont décrits: reprogrammation du métabolisme énergétique, la capacité à échapper au système immunitaire; les auteurs décrivent également 2 autres caractéristiques ("enabling characteristics") qui semblent indispensables à l'émergence de l'ensemble des hallmarks à savoir, l'instabilité génétique et l'inflammation tumorale

Le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses est en particulier exacerbé par rapport aux cellules normales, avec une capacité supérieure à importer et à métaboliser le glucose. Il en résulte une surexpression de protéines d'import du glucose comme GLUT1 (glucose transporter type 1), et une captation supérieure du glucose marqué au 18-fluor-deoxy-glucose (¹⁸FDG) lors de la réalisation de PET-scanner au ¹⁸FDG, permettant de détecter des envahissements tumoraux non suspectés par les autres moyens diagnostics.

En conditions physiologiques, la molécule de glucose est métabolisée en pyruvate qui en normoxie (pO_2 entre 4 et 20 mm Hg au niveau cellulaire), va être métabolisée via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale pour fournir 6 molécules de CO_2 (acide carbonique), 44 molécules de H_2O et 38 molécules d'ATP. Cette glycolyse correspond à la "respiration" mitochondriale. En l'absence d'oxygène ($pO_2 < 4$ mmHg) le glucose sera métabolisé dans le cytoplasme en pyruvate puis en 2 molécules de lactate, 2 H^+ , 2 molécules d' H_2O et 2 molécules d'ATP. Ce processus caractérise la glycolyse anaérobie ou simplement appelée "glycolyse" en opposition à la respiration ². Alors que la glycolyse ne fournit que 2 molécules d'ATP les cellules tumorales vont présenter un phénotype plutôt glycolytique que respiratoire, même en présence d'une pO_2 normale. La glycolyse fournit effectivement de manière plus rapide l'ATP et des précurseurs carbonés (molécules à 3 carbones facilitant l'anabolisme des lipides et de certains acides aminés) nécessaires au métabolisme exacerbé des cellules cancéreuses. Ce phénomène a été pour la première fois décrit par Otto Warburg et est couramment appelé "effet Warburg" ³ (Figure 2).

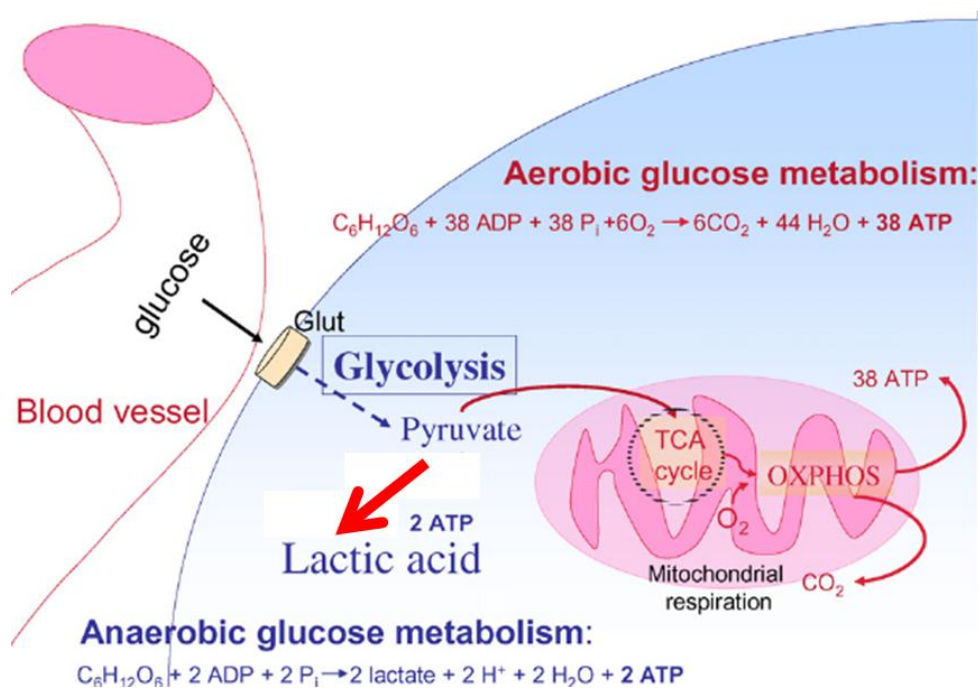


Figure 2. Le glucose est métabolisé soit via la mitochondrie en condition de normoxie pour donner 38 ATP, soit par voie anaérobie pour donner 2 ATP qui est en fait la voie privilégiée, même en normoxie (effet Warburg, flèche rouge) et plus souvent par les 2 voies selon les conditions du microenvironnement

La production massive d'acide lactique et d'acide carbonique va conduire la cellule tumorale à surexprimer des protéines impliquées dans l'export de ces déchets métaboliques car leur accumulation peut aboutir à une diminution du pH intracellulaire, à une altération considérable de l'activité de très nombreuses enzymes et à un stress cellulaire pouvant conduire à un effet cytostatique, ou dans le cas de déplétion de nutriments à la mort par "catastrophe métabolique" ³.

1.2. Les anhydrases

carboniques

Les anhydrases carboniques (CAs) représentent une famille de 16 protéines enzymatiques (métalloenzymes zinc) dont la distribution tissulaire varie selon l'isoforme et permettent l'hydratation réversible d'une molécule de CO_2 en $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ (Figure 3) ⁴.

L'expression tissulaire des CAs diffère selon l'isoforme. Au niveau cellulaire l'expression des CAs est soit cytosolique, soit membranaire. CAII est une protéine cytosolique, mitochondriale et membranaire des érythrocytes qui a un rôle physiologique majeur permettant les échanges gazeux échange d' O_2 avec CO_2 au niveau pulmonaire CAIX (chromosome 9p13.3) et CAXII (chromosome 15q22) sont des CAs membranaires dont le site catalytique est externe et permettent l'alcalinisation intracellulaire par facilitation de l'export

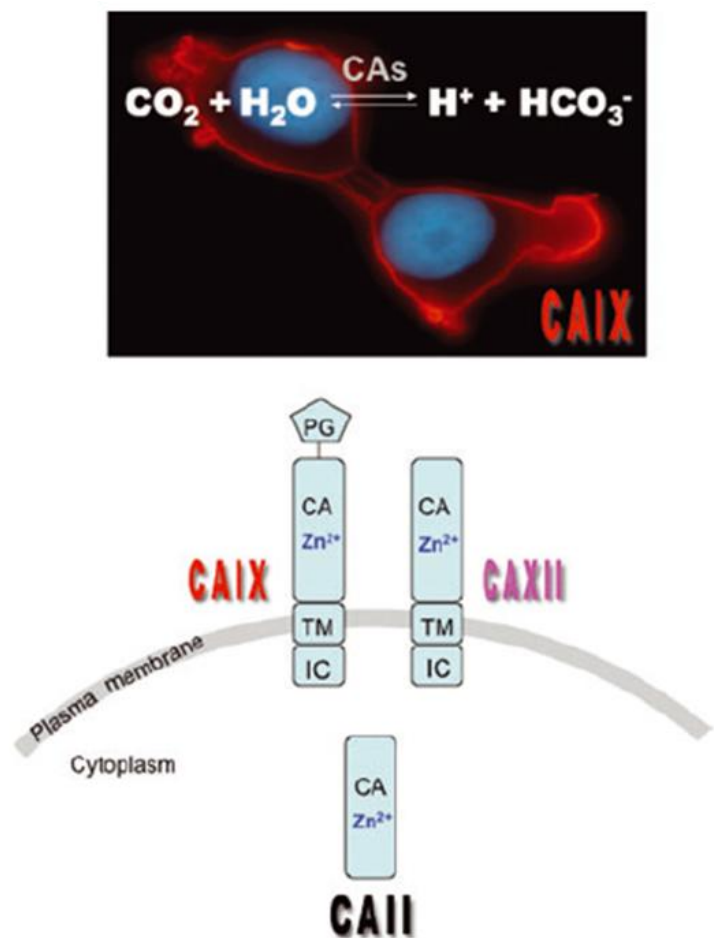


Figure 3. Anhydrases carboniques
(PG=protéoglycan, TM = transmembranaire,
IC = intracellulaire)

extracellulaire du CO₂. De ce fait, ces CAs en collaboration avec des échangeurs de bicarbonate participent à la régulation du pH intracellulaire. CAIX surtout mais aussi à un degré moindre CAXII sont les seules CAs régulées par le facteur transcriptionnel HIF-1⁵ activé dans des conditions hypoxiques.

L'expression de CAIX est physiologiquement restreinte à la muqueuse gastrique de l'estomac, du duodénum, de l'intestin grêle et de l'arbre biliaire⁶. L'expression de CAIX est en revanche très fréquente dans les cancers, et a souvent été retrouvée comme facteur de mauvais pronostic⁵. CAIX est la protéine dont l'expression est la plus fortement augmentée en réponse à l'exposition hypoxique dans les cellules humaines⁷ et elle possède l'activité catalytique la plus élevée d'hydratation du dioxyde de carbone⁸. L'équipe de Pastorekova a démontré que l'expression de CAIX permettait aux cellules tumorales d'acidifier le milieu extracellulaire⁹ et notre équipe a été une des premières à montrer qu'elle permettait également d'alcaliniser le milieu intracellulaire des cellules tumorales¹⁰. Bien que le "*silencing*" de CAIX par technique de shRNA inductible a permis de ralentir la progression tumorale in vitro^{10,11}, la sous-expression de CAIX n'entraîne pas de mort cellulaire, à cause, en partie, de la surexpression concomitante de CAXII¹⁰. Des essais thérapeutiques testant l'efficacité de l'inhibition de CAIX sont en cours dans de nombreuses tumeurs solides¹², notamment le girentuximab radioactif qui est une radio-immunothérapie ayant permis une stabilisation tumorale voire une réponse partielle lors d'une phase I dans les carcinomes à cellules claires du rein¹³.

CAXII a pour la première fois été décrit dans des cellules de carcinome à cellules claires du rein et a été retrouvé dans de très nombreux tissus sains¹⁴ (foie, poumons, tube digestif, rein, peau, cerveau entre autres). Il est surexprimé également dans de très nombreux cancers mais sa valeur pronostique est plus discutable¹⁵. In vivo chez la souris, toutefois, il semble que la double invalidation de CAIX et CAXII dans des lignées de carcinome du colon permettent une réduction plus importante de la croissance des xénogreffes¹⁰. Notre équipe l'a confirmé dans 2 autres modèles in vivo (poumon: A549, et mélanome: A375, données non publiées). L'impact d'autres anhydrases carboniques sur l'agressivité des cellules cancéreuses est en cours d'analyse (notamment CAII). Il est possible qu'une inhibition concomitante de CAIX et de CAII cytoplasmique conduisent à un effet acidifiant plus profond et donc à un effet anti-cancéreux plus prononcé. Il existe un pan-inhibiteur des anhydrases carboniques, l'acétazolamide (nom commercial DIAMOX®), couramment utilisé pour le traitement du mal des montagnes, le glaucome, l'alcalose aux soins intensifs et l'hypertension intracrânienne. Une récente étude a montré qu'il pouvait avoir un effet anti-cancéreux in vitro¹⁶ et in vivo¹⁷.

dans des lignées de carcinome bronchique.

1.3. Les transporteurs de monocarboxylates

A cause de l'effet Warburg la majorité des cellules tumorales sont "*glucose addict*" et consomment une grande quantité de glucose d'où la fixation fréquente de la majorité des cancers au PET-scanner au $^{18}\text{-FDG}$. Passant par la voie fermentative, le glucose va être métabolisé en pyruvate puis acide lactique (Figure 2 page 3) via la lactate déshydrogénase, principalement de type 5 (LDH-5 ou LDH-A) ¹⁸. L'acide lactique ainsi formé doit être expulsé du cytosol de manière à maintenir un pH intracellulaire légèrement alcalin > 7.2 . La diffusion passive de la forme acide lactique à travers la membrane plasmique ne se faisant qu'à très faible vitesse, l'export de lactate est opéré par des symporteurs lactate/ H^+ ou Mono Carboxylate Transporters (MCTs) qui sont généralement surexprimés dans les cellules hypoxiques et à croissance rapide. La famille des MCTs comprend 14 membres dont seulement 4 sont situés à la membrane plasmique. Il s'agit de protéines symports permettant le co-transport réversible d'un ion lactate. Leur structure et fonction ont été revues en 2012 par l'équipe d'Andrew Halestrap, pionnier dans ce domaine ¹⁹. MCT1, MCT2, MCT3 et MCT4 ont été décrits comme les seuls MCTs transportant les protons et les monocarboxylates. Les deux MCTs membranaires les mieux caractérisées dans les tumeurs sont MCT1 (chromosome 1p12) et MCT4 (chromosome 17q25.3). Les MCTs sont exclusivement exprimés à la membrane plasmique et possèdent 12 segments transmembranaires (Figure 4).

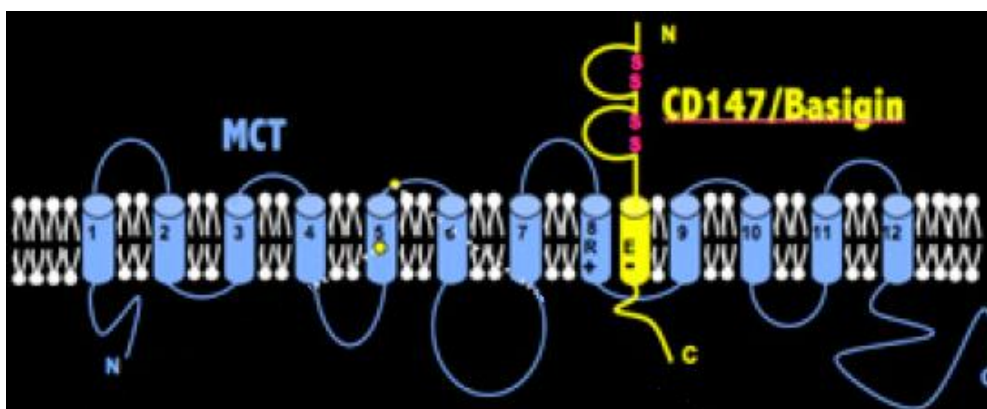


Figure 4. Structure schématique des MCTs membranaires

Ils permettent de transporter les monocarboxylates comme le pyruvate, le lactate, les corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate). Les MCTs 1 à 4 nécessitent l'association à une protéine membranaire chaperonne pour être conduits à la membrane plasmique et y être stabilisés. La protéine ancillaire la plus fréquemment décrite est la basigine (CD147/EMMPRIN, codé sur le gène 19p13.3), mais en son absence, l'embigine permet de jouer le rôle de chaperonne (*SLC25A3/gp70*, codée sur le gène 12q23). MCT1 a une expression quasi ubiquitaire alors que MCT4 a une expression plus restreinte, surtout dans les cellules du muscle strié squelettique, les cellules de la moëlle osseuse (leucocytes) et les cellules hypoxiques tumorales. L'autre différence entre MCT1 et MCT4 est que MCT1 permet le transport du lactate et du pyruvate avec une bonne affinité. MCT4 a une affinité moindre pour tous les substrats mais transporte exclusivement le lactate ¹⁹, d'où l'idée que MCT4 est le transporteur dédié du lactate. Ces caractéristiques, associées à une induction par HIF-1 expliquent sa surexpression dans les tissus hypoxiques et les tumeurs à croissance rapide comme les cancers du sein triple négatif ²⁰ et les gliomes ²¹ ainsi que dans les tissu normaux hautement glycolytiques (muscle). Le transport peut-être bi-directionnel selon l'utilisation de l'acide lactique. Il a notamment été décrit une surexpression des MCTs dans les fibroblastes du stroma, avec comme hypothèse, une recaptation de l'acide lactique par ces fibroblastes permettant l'oxydation de l'acide lactique en pyruvate et son recyclage comme source carbonée énergétique utilisée par les cellules tumorales. Cela a été décrit dans le cancer du colon ¹⁸ mais aussi en sens inverse dans le cancer de la prostate où un dialogue semble s'installer entre la cellule tumorale prostatique et la cellule fibroblastique du stroma ²².

Comme pour les CAs, l'invalidation de MCT1 et MCT4 par technique de shRNA inductible dans la lignée de cancer colorectal LS174 ou par un inhibiteur spécifique de MCT1 (Astrazeneca) dans une lignée de fibroblaste immortalisée CCL39, a permis de ralentir leur croissance in vitro, mais aussi in vivo dans des modèles de xénogreffes tumorales ²³. Comme pour les CAs il semble que l'effet anti-tumoral soit d'autant plus important que plusieurs MCTs sont invalidés puisque l'effet anti-tumoral in vivo est supérieur lorsque MCT1 et MCT4 sont invalidés dans ces mêmes modèles, par rapport à une invalidation d'un seul MCT ²³. L'invalidation de basigine est un autre moyen d'altérer la fonction de MCT1 et MCT4. Cela a été réalisé dans une lignée de cancer du pancréas avec un effet anti-tumoral ²⁴ ainsi que dans la lignée LS174 dans notre équipe ²³. Le ciblage des MCTs semble donc être une voie intéressante en clinique. Des inhibiteurs de MCTs sont actuellement en développement ciblant

MCT1 et MCT2²³ mais aussi des inhibiteurs spécifiques de MCT4 en cours de caractérisation. Par ailleurs une approche anticorps monoclonaux est développée par plusieurs industries pharmaceutiques pour le ciblage de Basigine/CD147.

1.4. Autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique

des cancers: HIF-1, C-Myc, LAT-1

HIF-1 et c-Myc sont deux facteurs transcriptionnels clefs qui jouent le rôle de chef d'orchestre dans la régulation du métabolisme énergétique.

1.4.1 HIF

HIF est principalement exprimé durant le développement embryonnaire et à l'âge adulte essentiellement au cours de processus pathologiques comme l'ischémie, la maladie d'Alzheimer, le diabète, le psoriasis et le cancer²⁵. HIF est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α oxygène-dépendante et d'une sous-unité β (récepteur de la dioxine) exprimée de façon constitutive^{26,27}. Il existe 3 isoformes de la sous-unité α déterminant les isoformes HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α , et 2 isoformes de la sous-unité β . Le gène *hif1a* est localisé sur le chromosome 14q23.2, le gène *hif2a* sur le chromosome 2p21 et le gène *hif3a* sur le chromosome 19q13.32. La régulation de la présence de HIF dans la cellule dépend de la concentration d'oxygène et fait appel à une régulation post-traductionnelle qui implique 3 senseurs de l'oxygène riche en Fer (dioxygénases), appelés protéines avec un domaine prolyl hydroxylase (PHD)²⁸. En condition de normoxie ($pO_2 > 5\%$) les PHDs sont actives et vont hydroxyler 2 résidus proline (Pro402 et Pro564) du domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) de HIF-1 α qui est lui-même situé sur la zone d'activation transcriptionnelle amino-terminale (N-TAD) (Figure 5). L'hydroxylation d'ODDD permet son ubiquitylation par la E3 ligase von Hippel-Lindau (VHL) et son trafic vers le protéasome pour y être dégradé²⁹. FIH (factor inhibiting HIF-1) est un autre senseur d'oxygène. Il s'agit d'une asparaginyl hydroxylase qui se lie de façon covalente au domaine d'activation transcriptionnel carboxy-terminal de HIF (C-TAD) empêchant ainsi l'interaction avec les co-facteurs de transcription comme p300²⁷. La diminution du taux d'oxygène entraîne l'inactivation des protéines à PHD, puis de FIH, pour des taux d'hypoxie plus sévère permettant l'interaction de

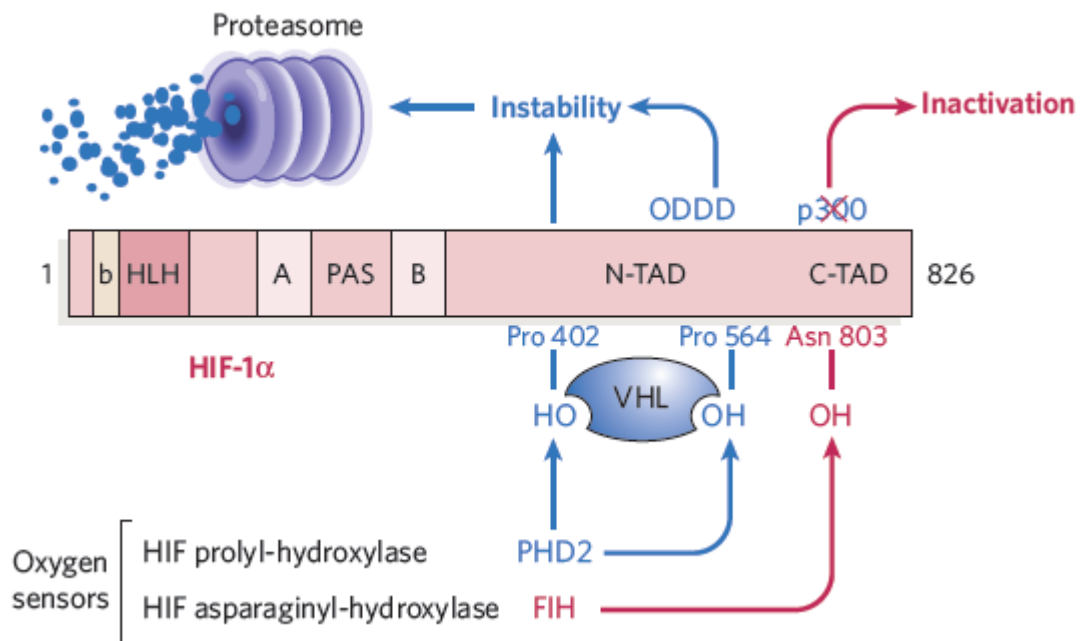


Figure 5. Structure de HIF-1: HIF-1 est un membre de la famille des protéines basic-helix-loop-helix PerArntSim (bHLH-PAS). Elle possède une activité transcriptionnelle "bi-céphalique" avec un domaine d'activation transcriptionnel amino-terminal (N-TAD) et carboxy-terminal (C-TAD) qui dépendent de l'interaction avec des senseurs d'oxygène que sont les protéines à domaine prolyl-hydroxylase (PHD) et le facteur inhibant HIF-1 (FIH); schéma issu de Pouyssegur et al, Nature (2006) ²⁷.

Après translocation dans le noyau HIF se fixe sur des régions du génome appelées hypoxia response elements (HRE) et va ensuite influencer positivement ou négativement l'expression de plus de 5% du génome (Figure 6), dont des gènes impliqués dans l'érythropoïèse (*EPO*), l'angiogénèse (*VEGF*, *ANG2*, *IL8*), l'autophagie (*BNIP3*, *BNIP3L*) et la migration cellulaire (*MMP2*), mais aussi dans l'homéostasie du pH (*CA9*, *CA12*, *MCT4*) et le métabolisme glycolytique (*GLUT1*, *HK2*, *PGK1*, *PDK1*, *LDH-A*) (Figure 6). A noter que l'activation de HIF peut ne pas seulement faire suite au stress hypoxique mais aussi en normoxie via l'interaction avec Ras, Raf, PI3K, Akt, mTOR, c-Myc, ou la délétion de P53, ING4, PTEN³⁰. Ce sont ces derniers mécanismes qui pourraient expliquer en partie l'effet Warburg.

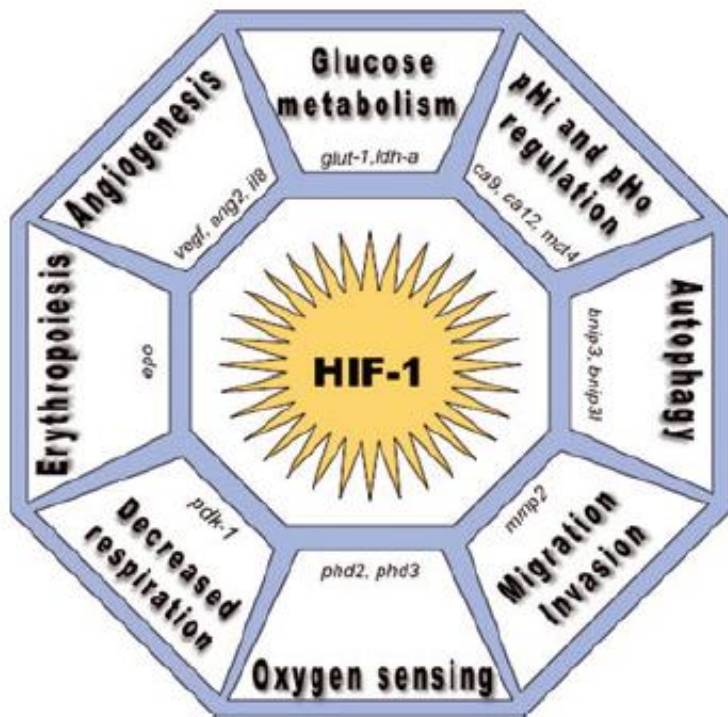


Figure 6. Gènes régulées par le facteur de transcription HIF-1: angiogénèse, métabolisme glucidique, régulation du pH intracellulaire, autophagie, invasion/migration, détection du taux d'oxygène, respiration mitochondriale, érythropoïèse

Chez l'homme l'expression de HIF est généralement corrélée à un plus mauvais pronostic que ce soit en terme de rechutes ou de décès, notamment dans les cancers ORL ³¹, les cancers vulvaires ³², les cancers du sein ³³, les glioblastomes ³⁴ et les cancers du rein ³⁵.

De nombreuses équipes ont tenté de développer des inhibiteurs de HIF ³⁶ sans succès étant donné l'importance de cette protéine et son caractère pléiotropique avec pour conséquence de nombreuses toxicités prévisibles. Il apparaît plus judicieux de cibler les protéines régulées par HIF, comme les protéines de régulation du pH intracellulaire (anhydrases carboniques) et les MCTs qui exercent une action négative sur la vitesse de la glycolyse.

1.4.2. c-Myc

Le gène *MYC* est un des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers, subissant le plus souvent des amplifications et des translocations ³⁷. Il est situé sur le chromosome 8q24 et code pour la protéine Myc (c-Myc) qui est un facteur de transcription qui interagit avec son partenaire Max pour transactiver ou réprimer les gènes cibles. MYC joue également un rôle physiologique important participant à la réparation tissulaire et a été identifié comme un des 4 facteurs permettant la reprogrammation cellulaire et la dédifférenciation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes ³⁸. Comme HIF, Myc peut se lier à de très

nombreux promoteurs de gènes (30% des gènes ³⁹) dont seulement une fraction va répondre. Myc va notamment permettre, via l'interaction avec E2F1, de réguler le métabolisme des acides aminés ³⁹, et via l'interaction avec HIF-1 de réguler les gènes du métabolisme glucidique ⁴⁰. Une des premières cibles identifiées pour c-Myc a été le gène codant pour LDH-A (chromosome 11p15.4) ⁴¹. Les autres partenaires glycolytiques identifiés ont été l'hexokinase 2 (HK2), la phosphofructokinase (PFKM) et l'enolase 1 (ENO1) facilitant ainsi l'import du glucose et sa conversion en pyruvate puis en lactate ³⁷. De nombreux gènes sont transactivés par HIF-1 et c-Myc, de manière concomitante, en hypoxie, et de manière exclusive par c-Myc en normoxie permettant la conversion du glucose en lactate (via LDH-A), même en normoxie, expliquant donc en partie l'effet Warburg.

c-Myc est capable d'activer de très nombreux gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale, favorisant l'oxydation du glucose dans le cycle de Krebs grâce à sa conversion en acetyl-CoA; c-Myc va également favoriser l'import de glutamine et la glutaminolyse mitochondriale. Li et al ont démontré que la masse mitochondriale est strictement corrélée à la fonction de MYC, montrant ainsi l'importance de ce gène dans le métabolisme énergétique des cellules tumorales ⁴². La figure 7 résume le rôle de c-MYC dans le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses.

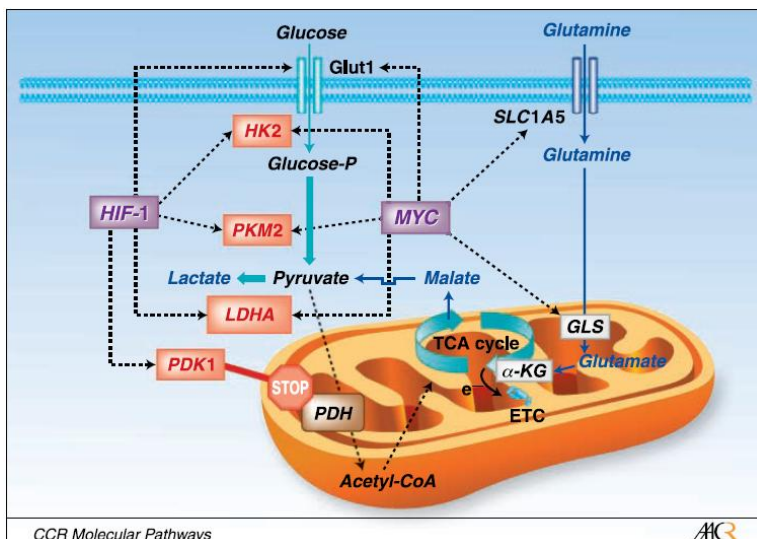


Figure 7. Myc et HIF-1 régulent le métabolisme du glucose (GLUT1, HK2, PKM2, LDHA, PDK1). Myc stimule également le métabolisme de la glutamine (SLC1A5, glutaminase GLS). L'induction de PDK1 qui bloque l'activité de la Pyruvate déshydrogénase est capitale dans le mécanisme de l'effet Warburg ³⁷

1.4.3. LAT-1

Les acides aminés sont la première source d'azote et sont utilisés pour la constitution des protéines mais aussi des nucléotides et du glutathion. Le squelette carboné des acides aminés est également parfois utilisé pour la génèse d'ATP et pourrait aussi contribuer à la synthèse des stérols et des lipides ⁴³. Du fait de la prolifération continue des cellules tumorales, les besoins en ces nutriments sont élevés et les cellules surexpriment donc, par rapport aux cellules normales, des transporteurs membranaires aux acides aminés, notamment L-type amino acid transporter 1 (LAT1) (chromosome 16q24.3). Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille SLC7 (cationic amino acid transporter/glycoprotein associated amino acid transporter family) comme LAT-2. LAT-1 se caractérise par sa propriété à transporter les acides aminés essentiels non synthétisés par la cellule. Ce transporteur a été caractérisé pour la première fois en 1998 ⁴⁴, transporte majoritairement la phenylalanine, le tryptophane, l'isoleucine, la valine, l'histidine et la méthionine alors qu'ASCT2 (ou SLC1A5, solute carrier family 1, neutral amino acid transporter, member 5; chromosome 19q13.3), l'autre transporteur essentiel des acides aminés, transporte plutôt la glutamine, cystéine, la thréonine, la sérine et l'alanine ⁴³. LAT-1 commence à être décrit comme facteur pronostic dans les cancers du rein ⁴⁵, les carcinomes adénoïdes kystiques ⁴⁶, les cancers des voies biliaires ⁴⁷, les cancers du pancréas ⁴⁸, du poumon ⁴⁹ et même les cancers du sein triple négatif ⁵⁰. Sa protéine chaperonne est la glycoprotéine CD98/4F2HC qui a aussi été décrite comme associée aux cellules souches cancéreuses des cancers ORL ⁵¹. L'impact pronostique d'ASCT2 n'a jamais été étudié en cancérologie.

Le niveau d'expression des protéines transportrices des acides aminés est finement régulé par la protéine kinase sensible à la rapamycine mTORC1 (Figure 8). mTORC1 est activée en amont par les voies de signalisation ERKs et AKT à condition que les niveaux d'ATP et d'acides aminés intracellulaire soient suffisants. Cette kinase est un véritable senseur énergétique via AMPK et senseur des acides aminés par sa translocation sur les lysosomes (source d'acides aminés issus de l'autophagie). Son action via l'activation de p70S6K ⁴³ contrôlant la traduction des protéines est capitale dans le processus de prolifération et d'entrée dans la phase de répllication de l'ADN. Tout blocage de LAT1 peut donc fortement impacter sur l'activité de mTORC1, la synthèse protéique et donc la croissance des cellules à fort "*turnover*" de croissance.

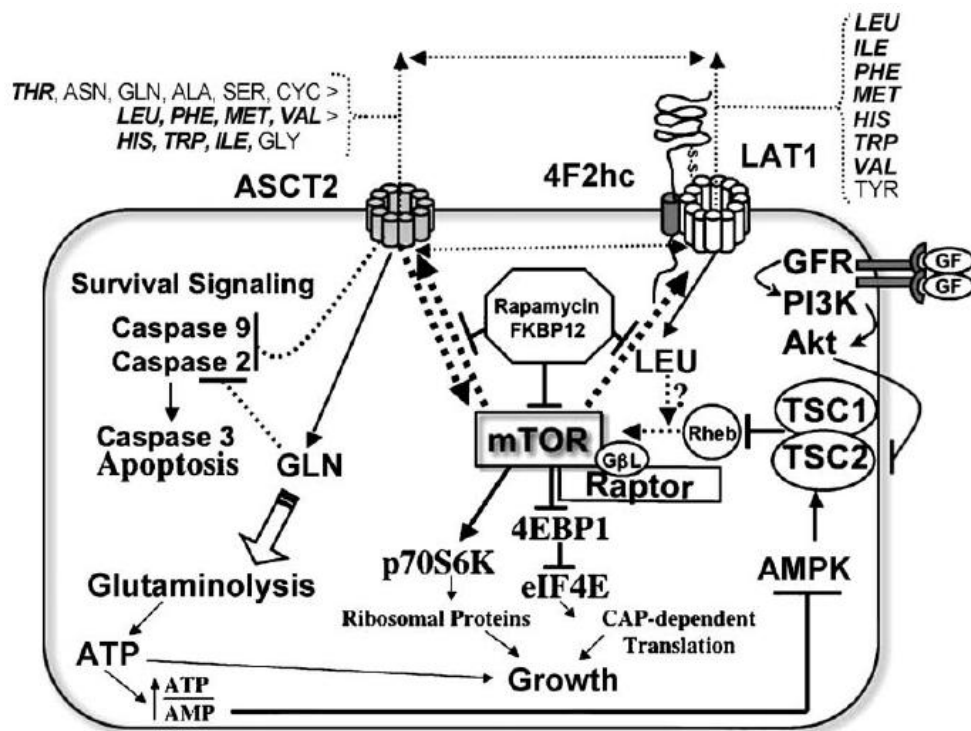


Figure 8. Transporteurs LAT1 et ASCT2 et régulation de leur expression par mTOR ⁴³

2. Les cancers du sein "triple négatif"

2.1. Définition

Le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme dans le monde, avec en particulier 39 620 décès attendus en 2013 aux Etats-Unis ⁵². Les cancers du sein triples négatifs correspondent à environ 15% des cancers du sein et sont caractérisés par l'absence d'expression des récepteurs nucléaires à l'estrogène et à la progestérone, et par l'absence de surexpression membranaire de Her-2 (c-erbB2) ⁵³. La définition du caractère triple négatif a été récemment communément admise avec un niveau d'expression de Her-2 qui doit être de 0, 1+ ou 2+ mais avec un test d'hybridation in situ négative (pas

d'amplification du gène). Le niveau de positivité des récepteurs hormonaux (moins de 1% ou 10% ?) n'a pas pour l'instant fait l'objet d'un consensus.

2.2. Caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires des cancers triple négatifs

Les patientes atteintes d'un cancer du sein TNEG sont plus jeunes, obèses ou avec un syndrome métabolique. Elles sont plus pré-ménopausées et les afro-américaines aux Etats-Unis sont plus à risque. Les tumeurs se réhaussent en IRM et fixent dans 100% des cas au PET-scanner couplé au ¹⁸ Fluor-déoxy-glucose ⁵⁴.

Au niveau histologique les cancers TNEG sont le plus souvent des carcinomes canalaux infiltrants, avec un index mitotique élevé avec un Ki-67 souvent > 20%, un haut grade SBR dans la majorité des cas, une nécrose centrale et une infiltration lymphocytaire fréquente témoignant d'une réponse anti-tumorale, souvent associé à un meilleur pronostic. Les cancers du sein TNEG se démarquent des 2 autres familles (Her-2 et récepteurs hormonaux positifs) par l'existence de types histologiques rares comme le carcinome médullaire, les carcinomes adénoïdes kystiques, les carcinomes sarcomatoïdes ⁵⁵, les carcinomes métaplasiques ⁵⁶ et les carcinomes apocrines ⁵⁷.

Les cancers du sein ont été classés au début des années 2000 en plusieurs sous-groupes moléculaires selon le profil d'expression d'ARNm avec l'identification du sous groupe luminal, Her-2, basal-like notamment, et qui correspondent grossièrement, respectivement, aux cancers du sein hormono-sensibles, Her-2 et triple négatif ⁵⁸. Les cancers du sein TNEG sont parfois assimilés aux cancers basal-like (ou basaux) mais à tort puisque le recouvrement des 2 entités n'est que de 70% ⁵⁹. Le sous-groupe TNEG "*claudine-low*" a été plus récemment décrit pouvant représenter 30% des patientes TNEG, exprime faiblement les claudines, est peu proliférant, enrichi en marqueurs de cellules souches, souvent en transition épithélio-mésenchymateuse, avec un mauvais pronostic ⁶⁰. Les cancers basaux, et une majorité de cancers TNEG, expriment les gènes associés aux cellules myoépithéliales mammaires, situé dans la couche basale, et permettant l'expulsion du lait dans les canaux galactophores. Ces

gènes correspondent aux gènes codant pour les cytokératines de haut poids moléculaire (CK5, CK14, CK17) et les marqueurs musculaires lisses (P-cadherine, caveoline 1, CD10, β 4-integrine) ⁶¹. Finalement le démembrement des cancers TNEG s'est complexifié avec l'étude de Lehmann et al ⁶² qui ont identifié au sein des cancers TNEG 6 sous-types: 2 basal-like, 1 sous-type immuno-modulateur, 1 sous-type mesenchymal, 1 sous-type mesenchymal stem-like et le sous-type luminal exprimant le récepteur aux androgènes. A l'instar des sarcomes, les TNEG regroupent de très nombreuses entités différentes dont les voies oncogéniques et donc les cibles thérapeutiques peuvent différer grandement.

Les données CGH-array et de séquençage à haut débit ont mis en évidence une instabilité génétique bien plus grande des cancers TNEG par rapport aux autres sous-groupes, avec des taux de délétion/amplification-gain et des taux de mutations bien plus élevés dans ce sous-groupe; notamment les mutations germinales de BRCA1 sont plus fréquentes dans les cancers TNEG (15% versus moins de 5% dans les autres cancers) ^{63,64}. Les gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers TNEG sont les gènes suppresseurs de tumeur *PARK2* (6%), *PTEN* (3%), *RB1* (5%), et les oncogène *EGFR* (5%), *ERBB2*, *ERBB3*, *BRAF* V600E et *PIK3CA* (6,2%) ⁶⁴. D'autres gènes sont également impliqués de manière récurrente dans des translocations avec fusion: *KRAS*, *IDH1* et *ETV6* ⁶⁴. Parmi ces gènes il existe déjà de nombreux traitements disponibles ciblant notamment les protéines EGFR, BRAF, ERBB2 et PIK3CA, que ce soit avec des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs des protéines à activité tyrosine kinase. Cela n'a toutefois pas ou peu été testé dans ce type de cancer.

2.3. Prise en charge actuelle des cancers du sein triple négatif

2.3.1. Traitement locorégional

Il n'est pas différent des autres cancers TNEG, à savoir chirurgie avec marges suffisantes, consistant en une tumorectomie, voire mastectomie si marge prévisible insuffisante ou résultat esthétique médiocre. En cas d'absence de ganglion cliniquement ou échographiquement suspect, la technique du ganglion sentinelle est réalisé avec curage axillaire complémentaire si sentinelle positif, sinon, lorsque les ganglions sont d'emblée suspects le curage axillaire est systématiquement réalisé.

En cas de tumorectomie une radiothérapie adjuvante est réalisée à hauteur de 50 Gy (2 Gy par fraction) ou 40,05 Gy (2,67 Gy par fraction) ⁶⁵ avec un complément de 10 à 16 Gy sur le lit tumoral. Une radiothérapie de la paroi thoracique peut être réalisée en cas d'une

accumulation de facteurs de mauvais pronostic. La radiothérapie ganglionnaire est réalisée en cas d'envahissement ganglionnaire tumoral (standard), ou de tumeur volumineuse (option) ou interne (option) selon les équipes.

2.3.2. Traitement adjuvant par chimiothérapie

Etant donné le mauvais pronostic du seul fait d'être TNEG, la chimiothérapie adjuvante est quasi systématiquement prescrite comme recommandé par la dernière conférence de consensus de Saint-Gallen ⁶⁶. De plus les données des chimiothérapies néoadjuvantes (données avant chirurgie en cas de tumeur inflammatoire ou pour permettre une chirurgie conservatrice) font état d'une grande chimiosensibilité des tumeurs TNEG comparé aux autres sous-groupes: 34% de réponse complète histologique versus 7% pour les tumeurs hormonosensibles après une chimiothérapie à base de taxanes et d'anthracyclines ⁶⁷.

La chimiothérapie la plus couramment utilisée est une chimiothérapie à base d'anthracycline (epirubicine ou adriamycine) associée à une taxane (paclitaxel ou docetaxel) permettant d'avoir les meilleurs taux de survie sans rechute et survie globale d'après l'étude GEICAM 9906 ⁶⁸.

Dans la situation de cancer du sein TNEG non métastatique il n'y a pas eu de nouvelle chimiothérapie ayant montré son efficacité par rapport à ce schéma classique, avec notamment l'échec de l'ajout du bevacizumab dans l'essai BEATRICE ⁶⁹, et bien qu'en néoadjuvant il semblait y avoir une supériorité en terme de réponse avec ce traitement ⁷⁰. Des analyses de sous-groupe pourrait permettre de mieux cibler les patientes qui en bénéficient.

2.3.3 Traitement des cancers du sein TNEG métastatiques

En phase métastatique, le pronostic des cancers du sein TNEG est très péjoratif car il n'y a, après progression sous chimiothérapie conventionnelle (anthracycline ou taxane ou 5-FU ou eribuline ⁷¹), aucun traitement qui a pour l'instant fait la preuve de son efficacité. Le bevacizumab (anti-angiogénique car anti-VEGF-A) associé au paclitaxel est une option en première ligne de traitement, ayant montré une survie sans progression supérieure au paclitaxel seule ⁷².

De nombreuses pistes sont explorées, mais pour l'instant sans aucun succès,

probablement du fait de l'hétérogénéité trop prononcée des cancers TNEG:

- les sels de platine et les inhibiteurs de PARP (poly-ADP ribose polymerase), puisque les cancers du sein TNEG sont majoritairement déficients pour réparer leur ADN,
- inhibiteurs de l'EGFR, mais les essais en phase métastatique sont pour l'instant décevants,
- les inhibiteurs de mTOR (mammalian target of rapamycin) ciblent la voie de la phospho-inositide 3-kinase (PI3K) dont l'activation est parfois retrouvée suite à la mutation du gène correspondant,
- le dasatinib, inhibiteur de SRC qui est fréquemment surexprimé dans les tumeurs TNEG,
- les traitements anti-androgéniques (bicalutamide, utilisé dans les cancers de prostate) étant donné la surexpression des récepteurs à l'androgène (AR) dans un certain nombre de cancers TNEG.

2.4. Le métabolisme glycolytique comme nouvelle cible thérapeutique dans les cancers du sein triple négatif ?

2.4.1. Données du PET-scanner au ¹⁸-FDG

Comme mentionné plus haut les cancers du sein triple négatif se caractérisent par une fixation intense et systématique au PET-scanner du ¹⁸-FDG. Basu et al ⁵⁴ ont montré dans une cohorte de 88 patientes comprenant 29 patientes TNEG et 59 patientes hormono-sensibles (ou RH+), que les cancers TNEG fixaient dans 100% des cas (100% de sensibilité) et, comparativement aux cancers RH+, la fixation était toujours nettement supérieure, d'un facteur 2 à 3, avec un SUV (standardized uptake value, valeur reflétant l'intensité de fixation du ¹⁸-FDG) de 7,2 versus 2,6 (p=0,003) 63 minutes après injection du ¹⁸-FDG. De façon intéressante, lorsque le SUV était mesuré 40 minutes après la première mesure, l'intensité continuait à augmenter dans les cancers TNEG, contrairement aux cancers RH+, avec une augmentation de 14% versus 3,7% (p=0,01).

Une autre étude a confirmé plus récemment ces résultats dans une cohorte de 78 patientes traitées avec une chimiothérapie néoadjuvante, avec 26 TNEG, 12 Her-2+ et 40 patientes RH+ ⁷³. Le SUV était respectivement de 9,8, 6,8 et 6,4 (différences statistiquement significatives, p<0,05) avant tout traitement. Ces valeurs étaient plus élevées que dans la première étude car il s'agissait de tumeurs de plus grande taille (localement avancées). Dans

l'étude de Basu et al, il existait en effet une différence significative de fixation entre les petites et grandes tumeurs, quelque soit le statut TNEG: SUV de 5,4 versus 9,2 et 1,9 versus 3,5 pour respectivement les tumeurs TNEG et les tumeurs RH+, de petite et grande taille (cut-off de 2 cm) ⁷⁴.

Le ¹⁸-FDG reflète l'activité glycolytique des tissus qui secondairement reflète la forte demande énergétique liée au taux élevé de division cellulaire. En effet plus une cellule est glycolytique, plus elle va exprimer GLUT-1 et plus elle va capter le glucose quelle que soit sa forme, notamment le ¹⁸-FDG. Du fait de ces 2 études, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les cancers TNEG ont, de manière générale, un métabolisme glycolytique exacerbé, encore plus que les cancers non TNEG. Les cancers TNEG doivent donc surexprimer l'ensemble de l'équipement enzymatique nécessaire au métabolisme accru du glucose et donc à l'export accéléré des acides carbonique et lactique essentiel au maintien du pH intracellulaire.

2.4.2. Résultats de la thèse du Dr Trastour (2011): détermination et impact pronostic du phénotype glycolytique des cancers du sein sans envahissement ganglionnaire (article qui inclura ce travail et le travail de ma thèse; en cours d'écriture)

Deux années auparavant, dans le cadre du travail de thèse de sciences du Dr Trastour (gynécologue-obstétricienne au CHU de Nice), une étude a été réalisée dans les laboratoires des Drs F. Ettore et J. Pouysségur visant à caractériser l'expression des protéines du métabolisme glycolytique et hypoxique (GLUT1, MCT1, MCT4, Basigine/CD147, LDH-A) et de régulation du pH intracellulaire (CAIX) au sein d'une cohorte de cancer du sein sans envahissement ganglionnaire, afin de mettre en évidence d'éventuels nouveaux facteurs pronostiques de survie pouvant identifier les patientes devant bénéficier d'une chimiothérapie.

Entre avril 1992 et novembre 2002, toutes les patientes traitées au Centre Antoine-Lacassagne (Nice), sans envahissement ganglionnaire, sans traitement néoadjuvant et avec une pièce opératoire disponible ont été incluses. A noter que les patientes Her-2 n'ont pas reçu de trastuzumab du fait de l'absence de disponibilité de la drogue avant 2003. Au total, 643 patientes ont été identifiées. L'âge médian était de 63,2 ans (25,9-87,9), le suivi médian était de 11,3 ans (0,2-18,4), il y avait 80,5% de tumeurs RH+ (527), 7,9% de tumeurs Her-2 positives (52) et 9,8% de tumeurs TNEG (64). Le traitement était comme déterminé dans les paragraphes précédents: chimiothérapie à base d'anthracycline en adjuvant, puis anthracycline

et taxanes fin années 90, hormonothérapie si RH+, radiothérapie si traitement conservateur.

De façon remarquable les protéines de régulation du pH et glycolytique étaient systématiquement largement surexprimées (sauf LDH-A) dans les cancers TNEG comparé aux autres sous-groupes, corroborant les données du PET-scanner au ¹⁸-FDG retrouvées dans la littérature (Tableau 1).

Les facteurs pronostiques de survie sans récurrence métastatique (SSRM) et de survie spécifique (SP) (= analyse du taux de décès liés au cancer) étaient (analyse de Log-Rank):

- la taille tumorale:

taux SSRM à 5 ans: 96,8% pour T1 versus 90,1% pour T2-T3-T4, $p=0,003$,

taux SP à 5 ans: 98,6% pour T1 versus 93,5% pour T2-T3-T4, $p<0,001$,

- le grade SBR:

taux SSRM à 5 ans: 97,3% SBR I, 94,4% SBR II et 91,8% SBR III, $p<0,001$,

taux SP à 5 ans: 99,2% SBR I, 95,7% SBR II et 96,2% SBR III, $p<0,001$,

- le Ki-67:

taux SSRM à 5 ans: 95,9% pour Ki-67 < 30% et 89,3% pour Ki-67 \geq 30%, $p=0,02$,

taux SP à 5 ans non statistiquement différents $p=0,09$,

- le statut RH+ vs TNEG vs Her-2 positif:

respectivement taux de SSRM à 5 ans de 96,3%, 92% et 88,5%, $p=0,007$,

respectivement taux de SP à 5 ans de 98,2%, 93,2% et 92,3%, $p=0,001$,

- le statut Her-2 positif vs négatif:

taux de SSRM à 5 ans de 95,9% si Her-2 négatif vs 88,5%, $p=0,007$,

taux de SP à 5 ans de 97,7% si Her-2 négatif vs 92,3%, $p<0,001$,

- le statut GLUT1:

taux de SSRM à 5 ans de 96% pour GLUT1 0 / faible vs 91,4% si moyen / fort, $p=0,01$,

taux de SP à 5 ans de 98,4% pour GLUT1 0 / faible vs 94,4% si moyen / fort, $p=0,008$,

- le statut MCT4:

taux de SSRM à 5 ans de 87,7% pour les tumeurs n'exprimant MCT4 qu'au niveau de l'épithélium tumoral, SANS expression stromale versus 96,5% pour les autres, $p=0,01$,

taux de SP à 5 ans de 98,4% pour tumeurs MCT4+ / stroma neg, versus 90,7%, $p<0,001$,

- l'âge au diagnostic (cut-off à 50 ans ou 40 ans) ($p=0,8$ et $p=0,3$ pour SSRM et SP

respectivement), CD147 ($p=0,6$ et $p=0,8$), MCT1 ($p=0,4$ et $p=0,4$), LDH-A ($p=0,08$ et

p=0,29), CAIX (p=0,09 et p=0,3), LAT1 (p=0,19 et p=0,19), le statut hormonal (p=0,3 et p=0,07) n'étaient pas reconnus comme facteurs de mauvais pronostic de SSRM ni de SP en analyse univariée.

En analyse multivariée, après avoir exclu Ki-67 qui était redondant avec le grade SBR (coefficient de corrélation de Spearman de 0,39, p<0,001) et d'impact pronostic moindre, et exclu Her-2 qui est redondant avec la variable TNEG vs Her-2 vs RH+, le statut MCT4 et le grade SBR ressortaient comme facteurs pronostiques indépendants de SSRM (tableau 2) et de SP (tableau 3).

Tableau 1. Marquage des protéines de régulation du pH et des protéines glycolytiques en fonction du sous-groupe de cancer du sein							
Sous-groupe	CA-IX	GLUT-1	LDH-A	MCT1	MCT4	Basigine	LAT-1
RH+	10,1%	15,7%	88,2%	40,9%	15,6%	40,7%	11,8%
Her-2 positif	37,3%	29,8%	94,1%	61,7%	32,6%	70,2%	29,2%
TNEG	67,7%	69,5%	87,1%	65,6%	55,9%	82,8%	71,4%
Chi-2	p<0,001	p<0,001	p=0,4	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tableau 2. Facteurs pronostiques indépendants de SSRM (régression de Cox)		
	Hazard Ratio (HR)	Valeur de p
Taille tumorale (T1 versus autres)	NA	0,21
Grade SBR I II/III	1 (référence) 2,41 [1,14-5,07]	0,02
Statut RH+ vs Her-2 positif vs TNEG	NA	0,3

GLUT1 (moyen/fort vs nul/faible)	NA	0,4
MCT4 Tumoral positif SANS marquage stromal Autres marquages (tumoral et stromal positif, ou stromal positif, ou négatif)	1 (référence) 0,47 [0,22-0,98]	0,04
NA = non applicable		

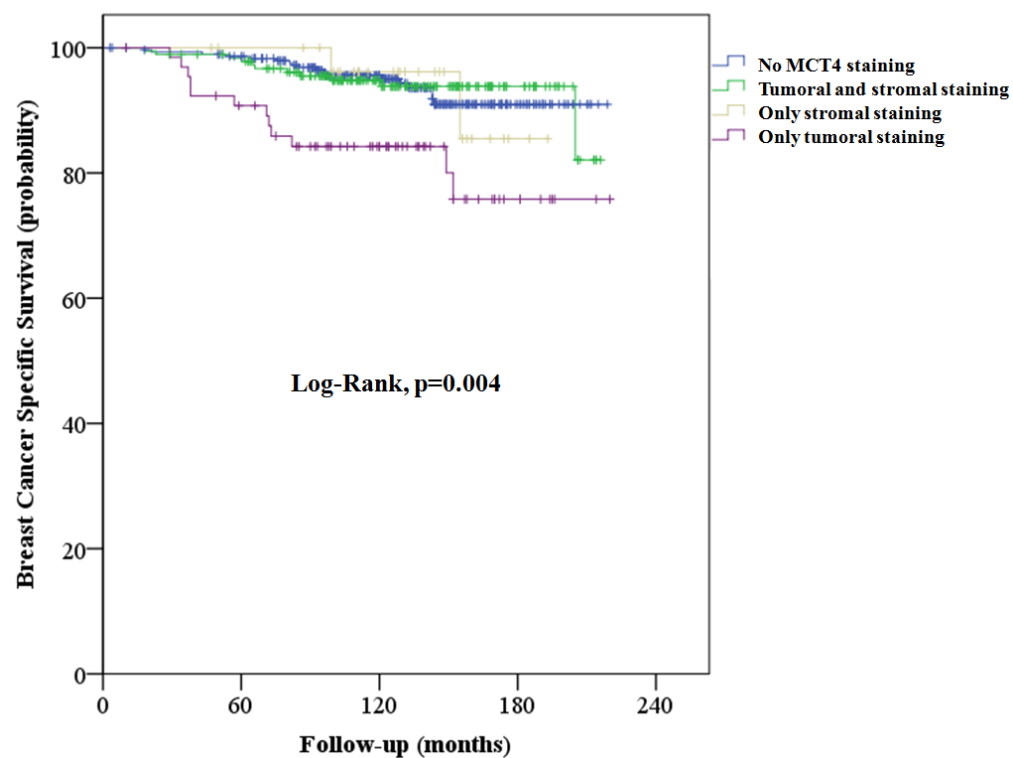
Tableau 3. Facteurs pronostiques indépendants de SP (régression de Cox)		
	Hazard Ratio (HR)	Valeur de p
Taille tumorale (T1 versus autres)	NA	0,15
Grade SBR I II/III	1 (référence) 3,29 [1,31-8,26]	0,01
Statut RH+ vs Her-2 positif vs TNEG	NA	0,2
GLUT1 (moyen/fort vs nul/faible)	NA	0,4
MCT4 Tumoral positif SANS marquage stromal Autres marquages (tumoral et stromal positif, ou stromal positif, ou négatif)	1 (référence) 0,45 [0,20-0,98]	0,04
NA = non applicable		

En stratifiant l'analyse de l'impact de MCT4 sur le statut RH, TNEG et Her-2 il apparaît que MCT4 semble être pronostic plutôt pour RH et Her-2 vis à vis de la survie spécifique (Log-Rank) (Figure 9):

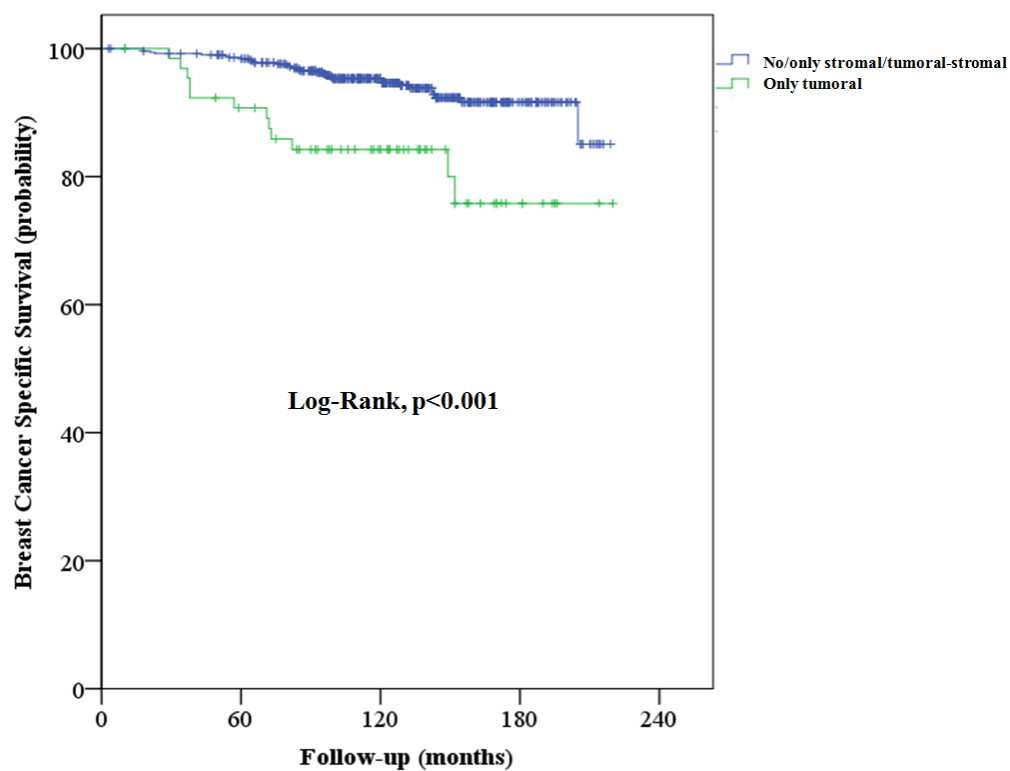
- RH+ : taux de SP à 5 ans de 99,1% si MCT4 négatif vs 92,9% si positif, p=0,005,
- Her-2 positif: taux de SP à 5 ans de 97,2% si MCT4 négatif vs 90% si positif, p=0,07,
- TNEG: taux de SP à 5 ans de 92,7% si MCT4 négatif vs 92,9% si positif, p=0,6

Figure 9.

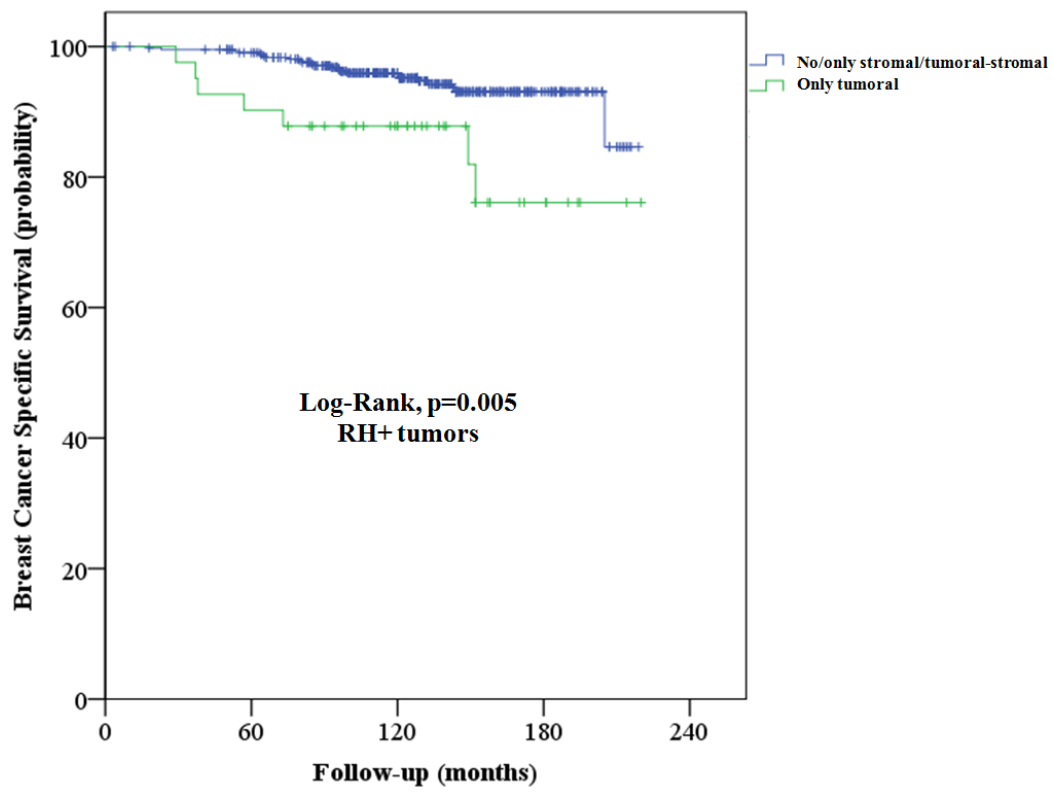
Courbes de survie spécifique en fonction du statut MCT4 tous cancers confondus (A, B), dans la strate RH+ (C), TNEG (D) et Her-2 surexprimé (E)



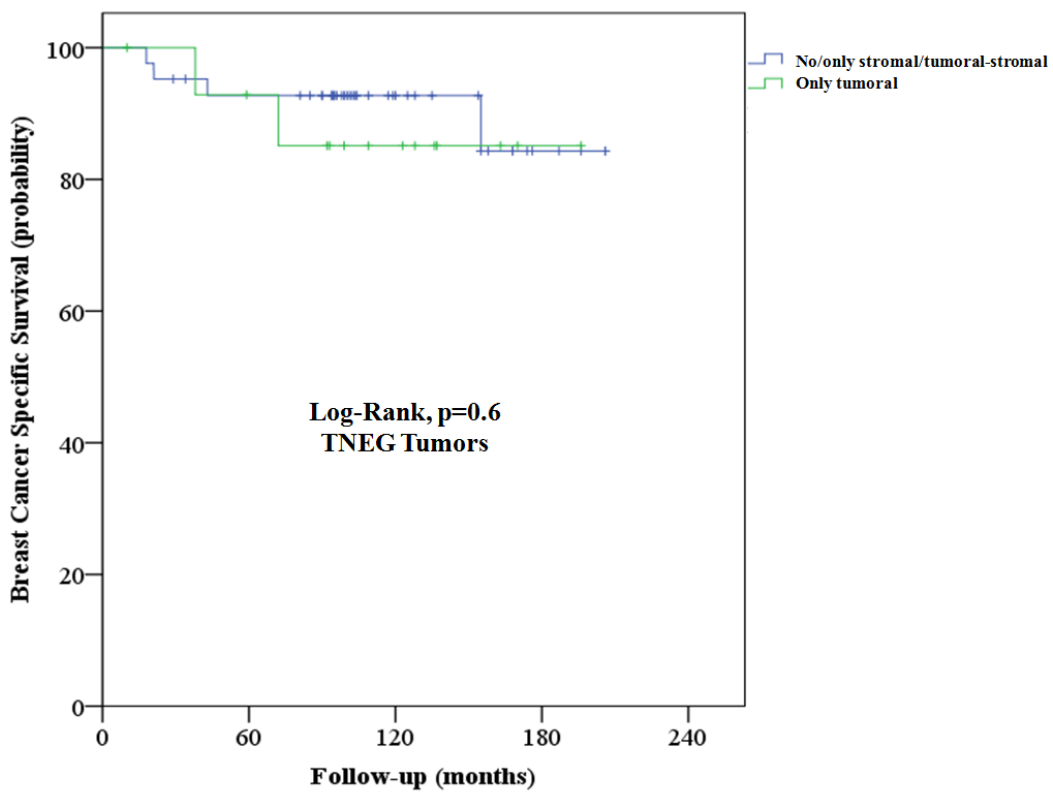
A.



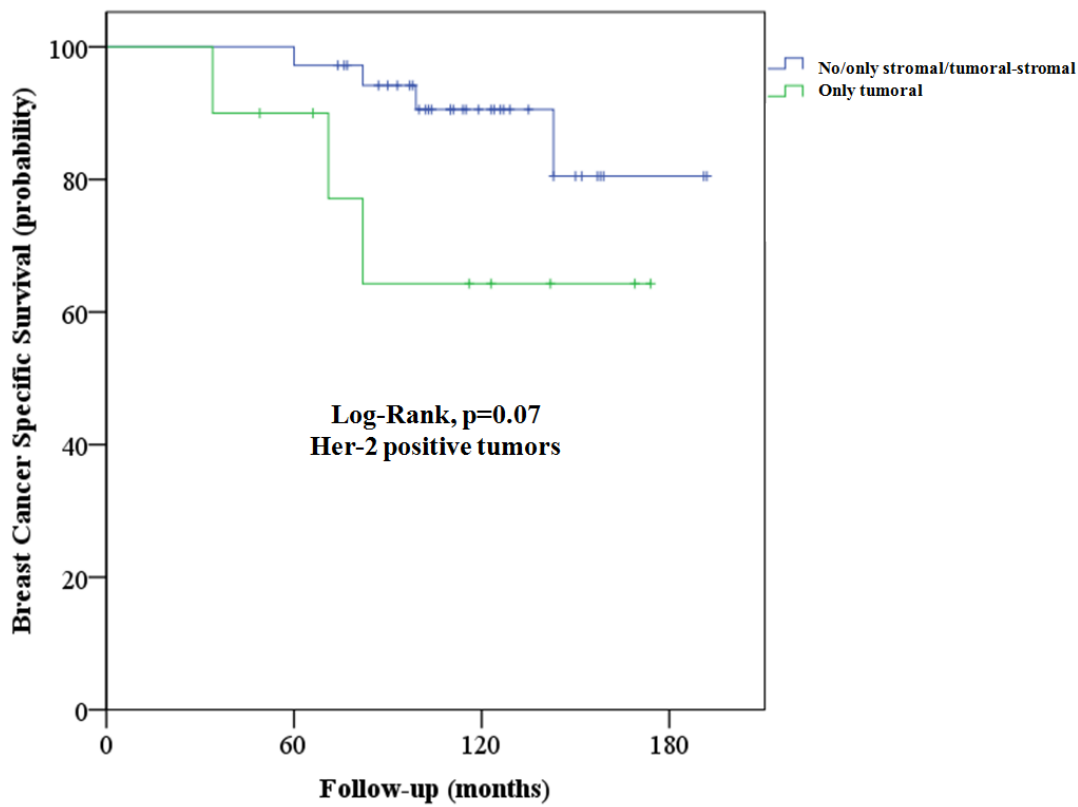
B.



C.



D.



E.

L'analyse du Ki-67 en fonction de chacun des marqueurs glycolytiques révèle que de manière générale, les tumeurs surexprimant les marqueurs glycolytiques ont un taux de prolifération plus élevée ($Ki-67 \geq 30\%$). De même, les tumeurs exprimant les marqueurs glycolytiques ont des grades SBR plus élevés et une taille plus élevée (Tableau 4).

Tableau 4. Grade SBR, taille tumorale et taux de Ki-67 en fonction des marqueurs glycolytiques						
	Ki-67 \geq 30%	Valeur p (Chi-2)	SBR II ou III	Valeur p (Chi-2)	T > T1	Valeur p (Chi-2)
CA-IX						
Négatif	8%	< 0,001	51,2%	< 0,001	20,2%	0,01
Positif	36,4%		77,6%		31,0%	
GLUT-1						
Nul / Faible	7,0%	< 0,001	48,4%	< 0,001	19,5%	0,007
Moyen / Fort	36,4%		84,3%		30,5%	
LDH-A						
Nul / Faible	11,1%	0,6	54,5%	0,6	26,8%	0,3
Moyen / Fort	13,4%		57,8%		22,1%	
MCT1						
Absent	4,4%	< 0,001	49,5%	0,001	19,5%	0,07
Présent	24,7%		64,0%		25,5%	
MCT4						
Autre	10,2%	< 0,001	53,6%	0,001	21,5%	0,01
Tumoral strict	41,3%		76,2%		35,4%	
Basigine						
Absent	3,7%	< 0,001	46,4%	< 0,001	20,8%	0,4
Présent	23,9%		64,6%		23,2%	
LAT-1						
Absent	4,8%	< 0,001	49,4%	< 0,001	19,3%	< 0,001
Présent	43,1%		87,0%		35,4%	

NB: le codage en immunohistochimie était réalisé de la manière suivante: 0 = pas de

marquage; faible = <50% des cellules marquées faiblement, ou <30% des cellules marquées moyennement, ou <10% des cellules marquées fortement; moyen = 50% des cellules marquées faiblement, ou $\geq 30\%$ et <50% des cellules marquées moyennement, ou $\geq 10\%$ et <30% des cellules marquées fortement; fort = $\geq 50\%$ des cellules marquées moyennement, ou $\geq 30\%$ des cellules marquées fortement,

Les conclusions de cette étude sont:

- 1)- Comme soupçonné sur les données du PET-scanner au $^{18}\text{-FDG}$ ^{73,74}, les tumeurs TNEG sont extrêmement glycolytiques (69,5% GLUT1-pos) et sont bien mieux équipées que les autres sous-groupes pour la glycolyse ou le transport des acides aminés, avec un différentiel d'expression de 2 à 3 en fonction du marqueur; à noter tout de même que ce phénotype est très différent d'un sous-groupe à l'autre avec, pour les tumeurs Her-2 un pourcentage non négligeable de tumeurs glycolytiques (29,8% GLUT-1 pos), et à un bien moindre degré pour les tumeurs RH+ (15,7% GLUT-1 pos); les tumeurs glycolytiques avaient de manière générale un fort taux de prolifération, des grades SBR plus avancés et une taille tumorale plus élevés.
- 2)- les facteurs classiques sont retrouvés comme facteurs de mauvais pronostic: la taille tumorale, le grade SBR et le Ki-67; l'âge au diagnostic ne ressortait pas (que le cut-off soit à 40 ou 50 ans), comme le statut hormonal (avec une tendance à significativité pour la SP); la différenciation en 3 sous-groupes RH+/TNEG/Her-2 pos, semble plus pertinente, du moins pour les tumeurs N-,
- 3)- dans cette série, le pronostic des tumeurs Her-2 positives, sans trastuzumab (aucune patiente n'a reçu ce traitement), est plus sombre que celui des TNEG ou des tumeurs RH+; les dernières séries publiées, à l'ère des traitements anti-Her-2 ont complètement inversé ce mauvais pronostic, qui est bien meilleur que celui des TNEG, et très proche des tumeurs RH+, avec dans une série rétrospective comprenant 663 patientes un taux de survie globale (SG) de 47,7% pour TNEG vs 80,2% pour luminal B (\approx RH+) et 72,3% pour les tumeurs Her-2 positives ⁷⁵; d'où l'importance d'avoir une cible pertinente, ce qui est le challenge pour les TNEG,
- 4)- la donnée la plus intéressante semble être l'impact pronostique de MCT4, à condition qu'il soit exprimé strictement au niveau tumoral, sans expression stromale; la discussion de l'impact du stroma sur le pronostic sera détaillée dans l'analyse de la thèse

sur les TNEG;

MCT4 semble être un nouveau facteur pronostic indépendant de SSRM et de SP dans les cancers du sein N-, aussi important que le grade SBR, mais plus important que les facteurs classiques que sont l'âge, le statut hormonal, Her-2, la taille tumorale;

une analyse de sous-groupe a montré que l'impact pronostique de MCT4 semble prononcé dans les tumeurs RH+ ($p=0,005$) et Her-2-positives ($p=0,07$), mais absent dans les tumeurs TNEG ($p=0,6$); cela reste une analyse de sous-groupe, les effectifs sont petits (RH+, $n=431$, TNEG, $n=57$, Her-2-pos, $n=46$), comme le nombre d'événements;

GLUT-1 était reconnu comme facteur pronostic également de SSRM et SP, mais uniquement en analyse univariée et LAT-1 n'a aucun impact pronostique; une cellule tumorale qui expulse efficacement l'acide lactique, ce qui est exactement le rôle de MCT4, va plus facilement faire des métastases et entraîner le décès, qu'une cellule qui n'est seulement capable d'importer le glucose en surexprimant GLUT-1, ou qu'une cellule qui est capable d'importer les acides aminés en surexprimant LAT-1.

En conclusion le travail du Dr Trastour a permis de fournir un nouveau facteur pronostique indépendant de SSRM et de SP dans les tumeurs sans envahissement ganglionnaire grâce au marquage MCT4. Ce marqueur reste à être validé dans une cohorte indépendante avant de pouvoir l'utiliser dans la décision de chimiothérapie. Notamment dans ce travail il n'a pas été recueilli le type de chimiothérapie reçu par les patientes, ce qui aurait pu permettre de voir si les patientes recevant la chimiothérapie et qui étaient MCT4 positives ont eu un meilleur pronostic que les patientes MCT4 positives n'ayant pas reçu de chimiothérapie.

2.5 Hypothèses scientifiques

Etant donné les résultats précédents les hypothèses scientifiques suivantes ont été posées:

- 1- quel est l'impact pronostique des marqueurs glycolytiques dans une cohorte homogène de cancers du sein TNEG ?
- 2- quel est l'impact de l'inhibition d'activité/délétion génique des marqueurs identifiés in vitro?
- 3- in vitro, est-ce que les lignées de cancers du sein TNEG sont glycolytiques/respiratoires comparativement à des lignées de cancers du sein RH+?

Ce projet a été soumis pour subvention à l'INCA en 2009 sous l'acronyme METABOTNEG et a reçu son approbation avec dotation de 300 000 € pour une période de 3 ans.

Il est divisé:

- en une partie clinique déterminant l'impact pronostique des marqueurs glycolytiques sur un tissu-micro-array comprenant 159 patientes,
- et une partie fondamentale qui vise à répondre aux 2 autres questions.

3. Matériel et méthodes

3.1. Partie clinique

3.1.1. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion étaient les suivants:

- patientes avec un statut triple négatif défini par l'absence (<1% des cellules) d'expression immunohistochimique (IHC) des récepteurs nucléaires aux estrogènes et progestérone, et l'absence d'amplification de Her-2 reconnue soit par un statut 0 ou 1+ en IHC, soit par un statut 2+ mais sans amplification avec technique ISH, confirmé par technique de tissu micro-array,
- pas de traitement néoadjuvant (ni chimiothérapie, ni hormonothérapie),
- sexe féminin,
- suivi clinique disponible, bloc tumoral disponible, en quantité suffisante (au moins 2 blocs tumoraux, l'un pour étude, l'autre à visée médico-légale, pour l'information du patient)
- pas de métastase d'emblée au diagnostic,
- toutes les patientes étaient traitées et suivies au Centre de Lutte contre le Cancer de Nice (Centre Antoine-Lacassagne).

3.1.2. Caractéristiques de la population et des traitements

Les caractéristiques de la population et des traitements sont détaillées dans le tableau 5. A noter que le statut TNEG des patientes a été rétrospectivement déterminé avant les années 2003 afin d'augmenter le nombre de patients. Etant donné les difficultés à connaître le statut

hormonal avant cette date, peu de patientes étaient disponibles avant cette date. L'indication de chimiothérapie adjuvante et de radiothérapie adjuvante étaient celles décrites dans le chapitre 2.3.

Tableau 5. Caractéristiques de la population et des traitements		
	No. de patients	%
Nombre de patientes	159	100
Age médian (années)	62 (25-85)	
Suivi médian (mois) de mai 1994 à novembre 2009	73 (3-173)	
Stade pT		
pT1	88	56.1
pT2	64	40.8
pT3	1	0.6
pT4	4	2.5
Manquant	2	
Stade pN		
pN0	102	65
pN1	37	23.6
pN2	12	7.6
pN3	6	3.8
Manquant	2	
Histologie		
Carcinome canalaire infiltrant	125	80.1
Carcinome médullaire 1	11	7.1
Carcinome métaplasique 2	5	3.2
Carcinome sarcomatoïde 3	2	1.3
Carcinome canalaire apocrine 4	5	3.2
Carcinome myoépithélial 7	1	0.6
Carcinome lobulaire infiltrant 8	3	1.9
Carcinome chondroïde 12	4	2.6
Manquant	3	
Grade SBR		
SBR I	4	2.8
SBR II	28	19.6
SBR III	111	77.6
Manquant	16	

Chirurgie		
Conservatrice	118	75.2
Mastectomie	39	24.8
Manquant	2	
Chimiothérapie adjuvante *		
Oui	117	78
Non	33	22
Manquant	9	
Radiothérapie adjuvante		
Oui	137	91.9
Non	12	8.1
Manquant	10	
* Avant 2004 chimiothérapie à base d'anthracycline, principalement de type FEC 100 (5-fluorouracil 500 mg/m ² , epirubicin 100 mg/m ² et cyclophosphamide 500 mg/m ² J1 = J21) 6 cycles, et après 2004 ajout de docetaxel 75 mg/m ² 3 cycles + 3 cycles FEC 100		

3.1.3. Immunohistochimie et tissu-micro-array (TMA)

A partir des archives du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques du Centre Antoine-Lacassagne (logiciel APIX ®) nous avons pu recueillir les données des patientes traitées et présentant un statut triple négatif ou récepteurs hormonaux négatifs (pour les patientes avant 2003). Les lames HES des tumeurs ont alors été sorties des archives et ont été triées pour chaque patiente de façon à sélectionner les lames où la tumeur était suffisamment représentative et de taille suffisante pour pouvoir être exploitée pour la construction d'un tissu-micro-array (TMA). Le tri a également été mené de façon à conserver suffisamment de tissus pour la patiente au cas où d'autres analyses devraient être nécessaires lors de son suivi. Les blocs ayant servi à l'analyse extemporanée ou fixés dans le boin n'ont été inclus (risque de problème de sensibilité des techniques d'immunohistochimie).

A partir de la lame sélectionnée par le Dr Ettore, le bloc de paraffine correspondant a été recherché aux archives et la zone tumorale a été cerclée sur la lame (figure 10a).

La construction du TMA a été réalisée à l'aide d'un Tissue arrayeur (Alphelys ®). Nous avons choisi d'utiliser 3 "spots" de 2 mm par tumeur (figure 10b) pour permettre d'avoir un maximum de représentativité de la tumeur compte-tenu de l'hétérogénéité tumorale. Chaque bloc constitué de TMA, comporte 144 spots soit 48 patientes (figure 10c). Nous avons

volontairement choisi de ne pas mettre plus de patientes par bloc pour faciliter la lecture et avoir suffisamment de marges pour éviter les décollements lors de la technique d'immunohistochimie. Entre chaque tumeur (3 spots), nous avons laissé un espace de façon à faciliter la lecture, et nous avons tracé des lignes de couleur différentes pour éviter les erreurs (figure 10d). Un spot de tissu splénique a été disposé devant le 1^{er} spot de la première ligne pour orienter le TMA. Nous avons réalisé 4 blocs de TMA (48 blocs représentés sur 3 lames et 40 blocs sur la 4^e lame) doublés au cas où le bloc est trop usé par la multiplicité des IHC réalisées, soit 368 tumeurs correspondant en fait à 184 patientes. Sur ces 184 au final seules 159 ont pu être incluses selon les critères d'inclusion définies précédemment. Une lame HES a été réalisée pour chaque bloc (figure 10e).

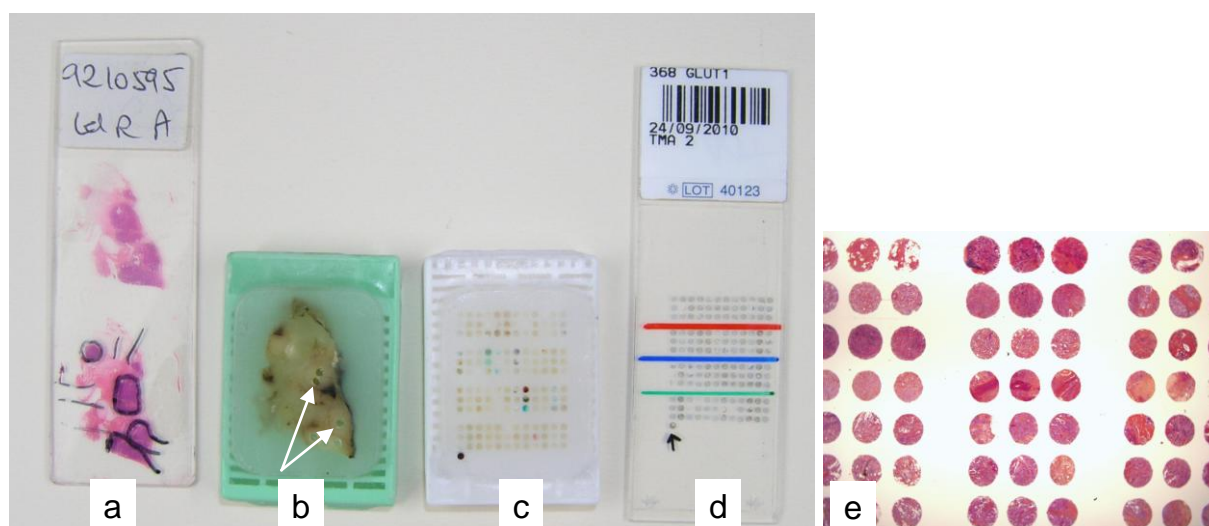


Figure 9 : Etapes de la construction des TMAs : a) lame HES choisie pour comporter des zones de tumeur invasive qui sont cerclées, b) bloc de paraffine correspondant à la lame HES pour être carotté au niveau des zones cerclées (flèches), c) bloc de TMA en paraffine comportant 48 tumeurs avec 3 spots de 1 mm par tumeur, d) lame d'immunohistochimie correspondant (la flèche noire en bas de la lame repère la rate qui oriente le TMA. Des lignes de couleurs facilitent la lecture, e) lame HES du TMA au grossissement x1,25.

Après coupe des blocs de paraffine au microtome (3 µm), les prélèvements ont été déposés sur des lames (Superfrost Plus, ThermoScientific ®) puis étalés. L'immunomarquage des lames était réalisée sur la plate-forme automatique Ventana ®. Après séchage pendant une nuit à 57°C, les coupes ont subi un déparaffinage standard automatique (chauffage à 75°, incubation 4 minutes, 3 bains de EZ Prep® (Ventana) avec rinçage entre, dépôt d'huile de paraffine puis chauffage à 76° et incubation 4 minutes). Ensuite, les lames ont été rincées pendant 30 minutes dans un bain d'eau distillée. Les conditions d'utilisation des anticorps

sont résumées dans le tableau 6. Un démasquage antigénique a été réalisé par incubation des lames dans un tampon Ventana, le CC1 (EDTA buffer pH 8.4) ou le CC2 (Tris-based buffer pH 7.6). Le démasquage s'est fait selon un cycle standard de 1 heure (sauf pour RE, RP, HER2, et LAT1 où nous avons utilisé un cycle court de 30 minutes). Ces conditions ont été choisies après la réalisation de tests préalables sur la plateforme Ventana® de plusieurs conditions, et nous avons choisi les conditions où le marquage était le plus optimal. Nous avons essayé également différentes conditions en technique manuelle, mais nous avons obtenu des marquages avec un effet de zone périphérique important et nous avons choisi de réaliser notre étude sur plateforme automatisée pour obtenir des résultats plus standardisés. Les anticorps utilisés ont été d'abord validés *in vivo* à partir de tissus tumoraux de xénogreffes inclus en paraffine. Les xénogreffes ont été obtenus à partir d'une lignée de cellules tumorales d'adénocarcinome du colon (LS174Tr) qui surexprime toutes les protéines étudiées et dans les quelles des 'silencing' inductibles (MCT1, MCT4 et Basigin, CD98, LAT1) ou délétions par ZFN (Basigin, MCT4, LAT1) ont été réalisés dans notre équipe^{10,23}.

Tableau 6. Liste des anticorps (Ac) utilisés pour l'immunohistochimie du tissu-micro-array						
Ac	Type	Référence	Tampon démasquage	Durée démasquage	Dilution	Durée d'incubation
RE	monoclonal	Ventana	CC1	Court : 30 min	seringue pré remplie	20 min
RP	monoclonal	Ventana	CC1	Court : 30 min	seringue pré remplie	20 min
HER2/neu	monoclonal	NCL-CB11 Novocastra, Ventana	CC1	Court : 30 min	seringue pré remplie	20 min
CA IX	monoclonal	MN75, Bayer	CC2	Standard : 1h	1/5000	32 min
GLUT1	polyclonal	Ab15309, AbCam	CC1	Standard : 1h	1/750	32 min
MCT1	polyclonal	anti SLC 16A1, Sigma Prestige	CC2	Standard : 1h	1/100	1 h
MCT4	polyclonal	Anti-SLC 16A3, Sigma Prestige	CC2	Standard : 1h	1/50	32 min
CD147	monoclonal	LS-C14277, Life span Biosciences	CC1	Standard : 1h	1/25	32 min
CD98	polyclonal	(H-300): Sc-9160, Santa Cruz Biotechnology	CC1	Standard : 1h	1/100	32 min
LAT1	polyclonal	Trans Genic KE026	CC2	Standard : 1h	1/200	1h30
LDHA	polyclonal	Ab47010, Abcam	CC1	Court : 30 min	1/300	1h30
C-myc	Monoclonal	Y69, Epitomics	CC1	Standard : 1h	1/50	1h30

Pour HER2, les tumeurs côtées 2+ en immunohistochimie ont été analysées séparément avec une lame d'IHC par tumeur et réalisation d'une DISH (Dual in situ hybridization) a été réalisée avec marquage du chromosome 17 et une sonde pour HER-2 (sondes et réactifs Ventana). HER-2 a été considéré comme amplifié lorsque le rapport HER-2/chromosome 17 était supérieur à 2,2.

Après montage des lames (Eukitt), celles-ci ont été analysées sous microscope par le Dr Ettore au microscope multi-tête et en aveugle par rapport au devenir des patientes.

Le codage en immunohistochimie pour LDH-A et GLUT-1 était réalisé de la manière suivante: 0 = pas de marquage; faible = <50% des cellules marquées faiblement, ou <30% des cellules marquées moyennement, ou <10% des cellules marquées fortement; moyen = 50% des cellules marquées faiblement, ou $\geq 30\%$ et <50% des cellules marquées moyennement, ou $\geq 10\%$ et <30% des cellules marquées fortement; fort = $\geq 50\%$ des cellules marquées moyennement, ou $\geq 30\%$ des cellules marquées fortement,

3.1.4 Statistiques

Données qualitatives:

- présentées sous formes de fréquence absolue, fréquence relative, intervalle de confiance à 95%, pourcentage de données manquantes,
- ces données sont comparées à l'aide de test du Chi2 ou de test de Fisher en cas de non respect des conditions d'application du Chi2.

Données quantitatives :

- présentées sous formes de médiane, extrême, moyenne, écart type et pourcentage de données manquantes,
- le test de Mann-Withney était utilisé pour comparer les variables quantitative, pour s'affranchir du risque d'absence de normalité.

Données de survie:

- les survies sans récurrence, sans récurrence locale, sans récurrence métastatique, globale et spécifique correspondaient à la durée entre la date du diagnostic et la date de survenue de l'évènement,
- la représentation graphique utilisait la méthode de Kaplan Meier, et la comparaison de courbes de survie utilisait la méthode de Log-Rank,

- les facteurs pronostiques reconnus en analyse univariée (Log-Rank) étaient ensuite incluses dans le modèle de Cox afin de déterminer les facteurs pronostiques indépendants; si 2 variables étaient redondantes ou fortement corrélées (corrélations réalisées par le test de Spearman), une seule des 2 était conservée dans le modèle (typiquement la plus corrélée à l'événement étudié),
- les différences observées par les tests statistiques étaient considérées comme différentes si la valeur de p était strictement < 0.05 (hypothèse bilatérale).

Le logiciel statistique utilisé était le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 16.0, Chicago).

3.2. Partie fondamentale

3.2.1. Culture cellulaire et exposition à l'hypoxie

Quatre lignées tumorales ont été utilisées: MDAMB-231, Hs578T, T47D et MCF7 (ATCC: American Type Culture Collection), les 2 premières lignées étaient réputées triple-négatives et les 2 dernières hormono-sensibles.

Les cellules étaient maintenues dans un milieu de culture DMEM (Sigma) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, avec pénicilline-streptomycine, dans un incubateur en atmosphère humide avec 5% de CO₂, 95% d'air à 37°C (condition définissant la condition NORMOXIE). L'incubation en HYPOXIE se faisait à 1% d'O₂, à 37°C, avec 95% d'humidité, 5% CO₂/94% N₂ dans une enceinte "bugbox" anaérobie (Ruskin®).

3.2.2. Détermination du statut hormonal et Her-2 des lignées tumorales

Les cellules tumorales ont été mises en culture dans des diamètres 100 en normoxie, protégées à confluence 75% (1 million de cellules par boîte environ) puis, après décollement par scrapping (et non par trypsine afin de conserver les marqueurs membranaires) les cellules d'une dizaine de boîtes ont été réunies, puis centrifugées. Le culot ainsi obtenu était fixé avec du formol pendant 4 heures puis inclus en paraffine. De la même manière que pour les lames de TMA (3.1.3) le marquage pour RE, RP et Her-2 s'est réalisé à l'aide de l'automate Ventana®.

3.2.3. Mesure de la consommation en oxygène et de la production de protons

La respiration, reflétée par la consommation d'oxygène (oxygen consumption rate =OCR) et la glycolyse, reflétée par la production de proton ou acidification extracellulaire (extracellular acidification = ECAR) étaient mesurées à l'aide de l'automate Seahorse XF96 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). Les expériences étaient réalisées selon les instructions de l'industriel. Brièvement: les cellules sontensemencées dans une plaque de 32 puits (50 000 - 75 000 cellules / puits). A confluence, typiquement un jour après, les puits sont mises au contact d'électrodes au sein de l'automate (Figure 11) qui mesure en temps réel le taux d'oxygène et la production de protons. Une trentaine de mesure sont réalisées (mais plus de mesures sont disponibles) toutes les 5 minutes, et avant chaque mesure des composés chimiques peuvent être injectés dans le milieu de chaque puits afin de tester son influence sur l'OCR et l'ECAR. En général chaque colonne contient la même condition permettant un quadruplicate de l'expérience. Par la suite le contenu cellulaire de chaque puits est entièrement récupéré et lysé afin de déterminer la teneur en protéine, afin de normaliser les résultats.

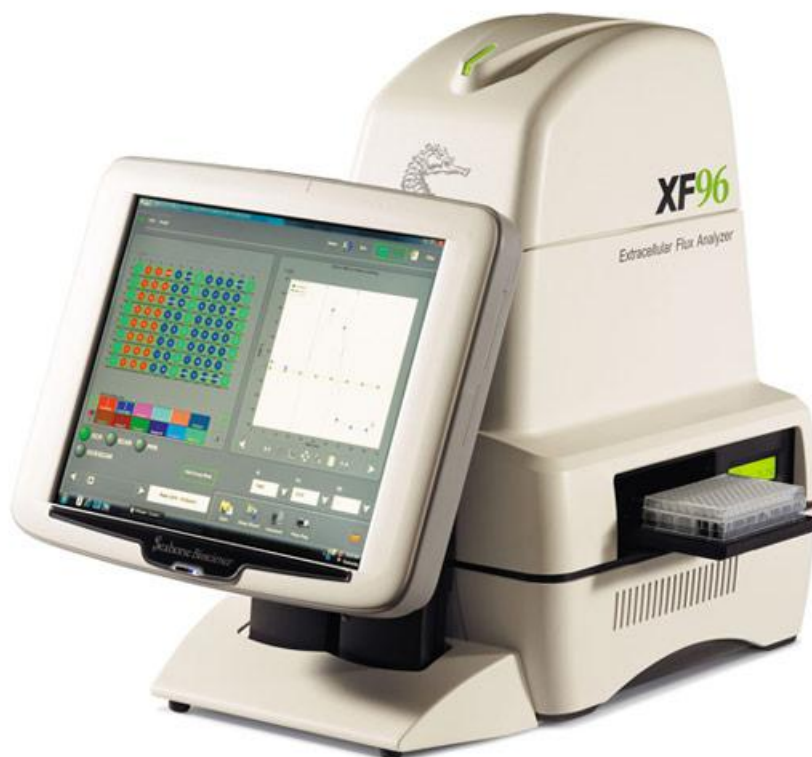


Figure 11. Exemple d'automate Seahorse; la plaque 32 puits est inséré sur le côté droit de l'automate qui mesure l'ECAR et l'OCR qui sont retranscrits sur l'écran détaillé

3.2.4. Délétion de MCT4 par technique des Zinc Finger Nucléases

Une tentative de délétion du gène MCT4 par Zinc Finger Nucléases a été réalisée dans les lignées triple négatives MDAMB-231 et Hs578t. Les 2 lignées ont été transfectées 2 fois en une semaine par 2 plasmides ZFN exprimant la nucléase FokI designée à notre demande par Sigma-Aldrich (CompoZr Custom ZFN). La coupure de l'ADN double brin désignée se situe dans la partie codante du 5^o segment transmembranaire de MCT4. Les cellules transfectées ont ensuite été triées par FACS pour détecter et trier les cellules ayant une réduction de l'expression de surface Basigine, une indication de la suppression ou réduction de MCT4 à la surface. Chaque cellule triée était ensuiteensemencée dans un puits d'une plaque 96 puits. Parmi les clones ayant survécu à ce tri un dernier test fonctionnel permettait de réellement identifier les clones qui n'étaient plus capables d'exporter correctement l'acide lactique: les clones étaient ensemencés en duplicate, le contrôle (servant également pour le stock) et le puits expérimental où les cellules étaient exposées à la combinaison oligomycine (1 µg/mL, inhibition complète de la respiration mitochondriale) / inhibiteur de MCT1 (Astrazeneca ®, 300 nM) (inhibition de l'export résiduel d'acide lactique par MCT1). Dans ces conditions seules les cellules ayant une glycolyse fonctionnelle peuvent survivre. Donc toute cellule déficiente en MCT4 sera sensible à l'inhibiteur de MCT1. Par la suite la perte de MCT4 était vérifiée par technique de Western Blot.

3.2.4. Western blot

Les cellules étaient lysées dans du Laemmli 1,5X. La migration de 40 µg de protéines était obtenue sur un gel 7.5% SDS polyacrylamide. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride. Les membranes étaient ensuite hybridées avec l'anticorps primaire MCT4 (Sigma Prestige, SLC16A3), Basigine (Life Span, LS-C14277), ARD-1. Un lysat de protéines LS174shca9/shca12 (double invalidation de CAIX et CAXII) surexprimant MCT4, MCT1, Basigine, était également déposé sur la membrane pour contrôle positif.

3.2.5. Clonogénicité

Les cellules étaientensemencées à hauteur de 1000 cellules par diamètre 60. Un jour après les cellules devant proliférer en hypoxie étaient transférées dans l'enceinte anaérobie à 1%. Quarante-huit heures après prolifération en hypoxie (le temps que l'ensemble des gènes hypoxiques s'activent) et en normoxie, le milieu était changé avec les conditions et les inhibiteurs adéquats (phenformin 50 μ M, et inhibiteur de MCT1, Astrazeneca AR-C155858⁷⁶, 300 nM). 7 jours après exposition à la condition voulue en normoxie, et 10 jours en hypoxie, les clones restant étaient fixées au GIEMSA.

4. Résultats

4.1. Partie clinique

4.1.1. Marqueurs glycolytiques dans les cancers TNEG

Le marquage des protéines glycolytiques et des protéines de régulation du pH intracellulaire est décrit dans le tableau 7.

Tableau 7. Marquage des protéines des protéines glycolytiques et de Ki67

CA-IX positif	GLUT-1 moyen/fort	LDH-A moyen/fort	MCT1 positif	MCT4 tumoral	MCT4 total	Basigine positif	LAT-1 positif	c-Myc positif	Ki-67 (≥30%)
54.1%	61.6%	96.8%	62.3%	57.2%	86.0%	76.7%	44.7%	81.8%	51.0%

Les différents marquages sont représentés dans les figures 12 à 21 (carottes des TMA):

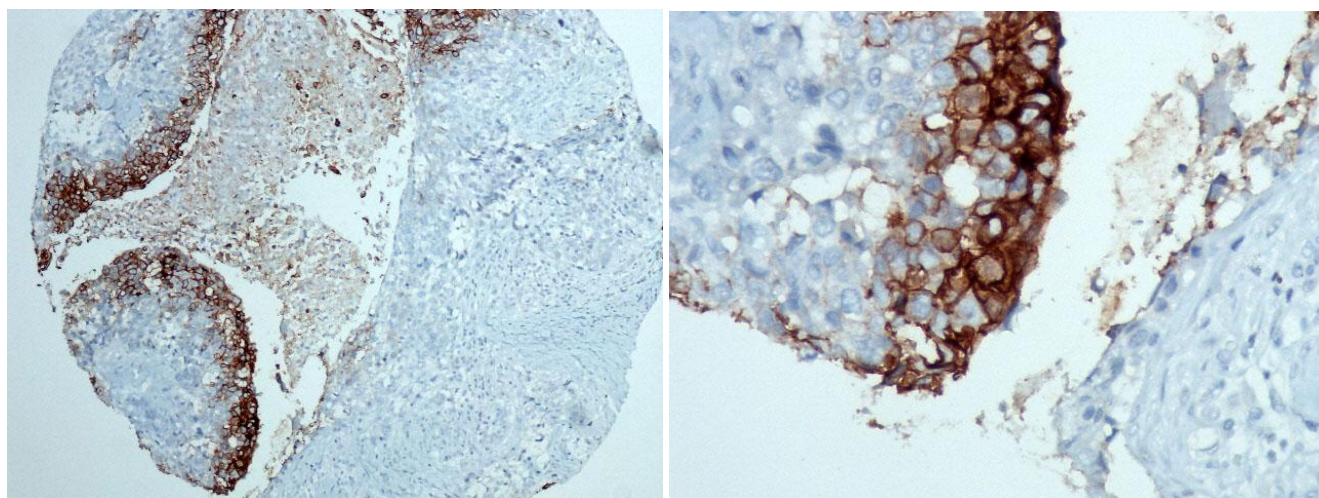


Figure 12. IHC de CAIX (X100 à gauche, et X400 à droite) - le marquage est membranaire et est maximal près des zones hypoxiques et nécrotiques, témoignant de la régulation de l'expression de CAIX médiée par l'hypoxie (et HIF)

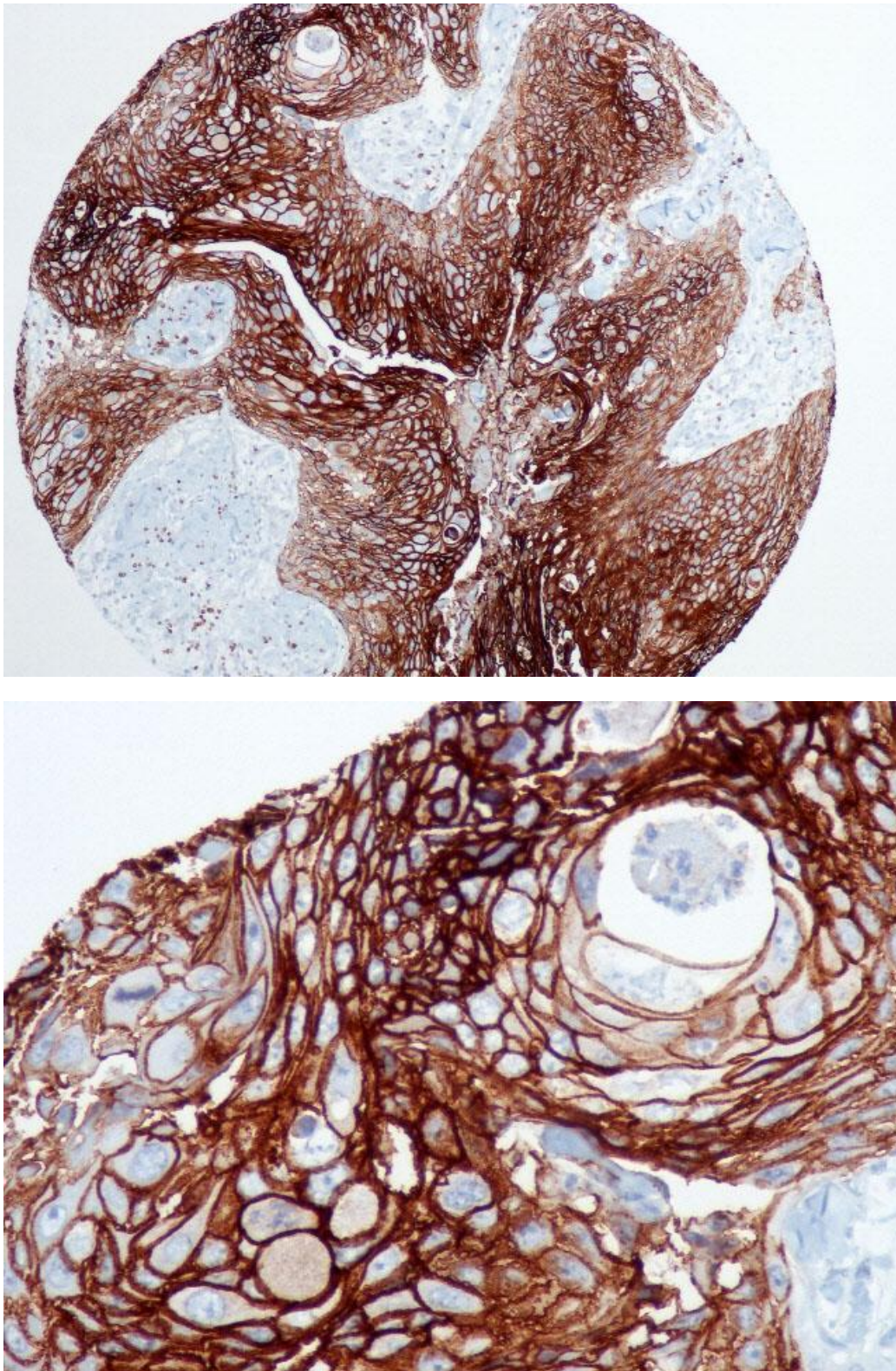


Figure 13. IHC de GLUT-1 (X100 en haut et X400 en bas) - le marquage est membranaire; pas de corrélation stricte avec l'oxygénation tissulaire dans cette tumeur (effet Warburg)

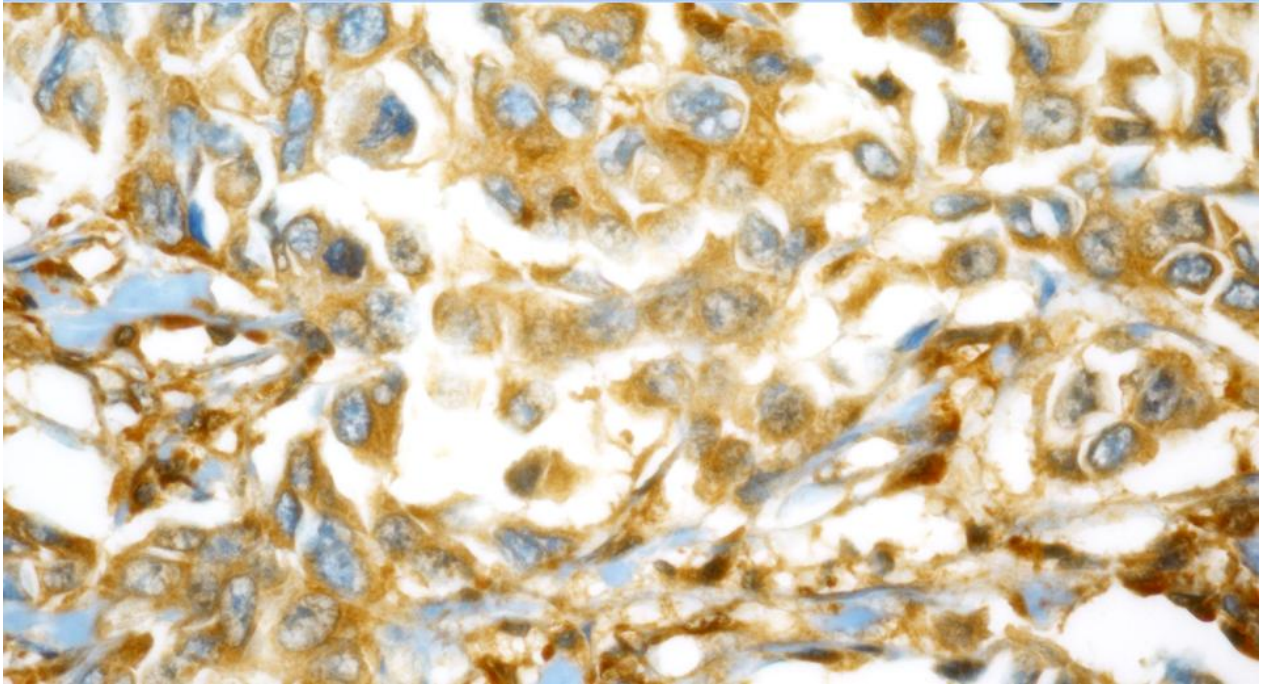


Figure 14. IHC de LDH-A; marquage cytoplasmique (X600)

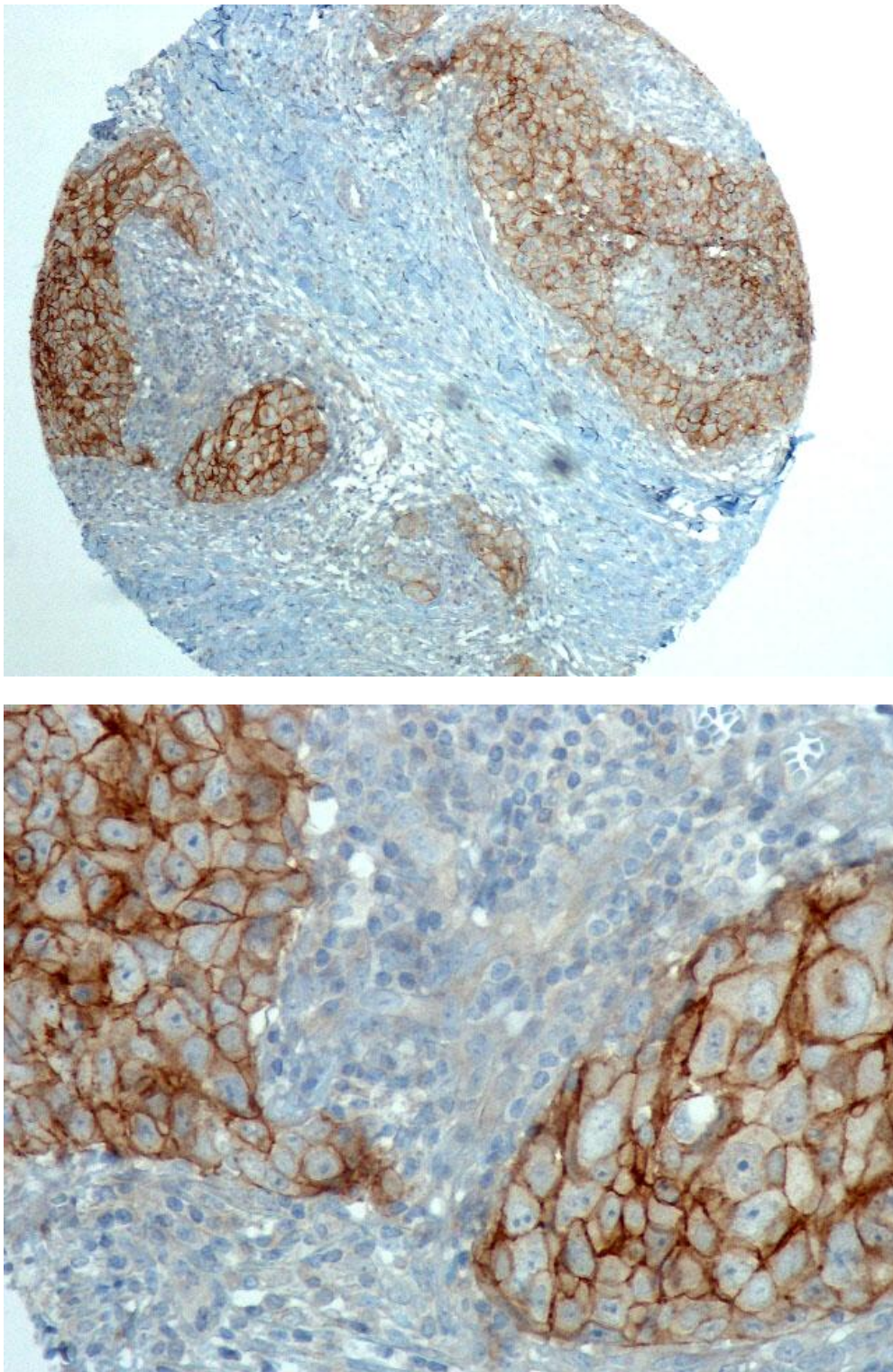


Figure 15. IHC de MCT1 (X100 en haut, X400 en bas), marquage membranaire; pas de corrélation stricte avec l'oxygénation tissulaire dans cette tumeur (effet Warburg)

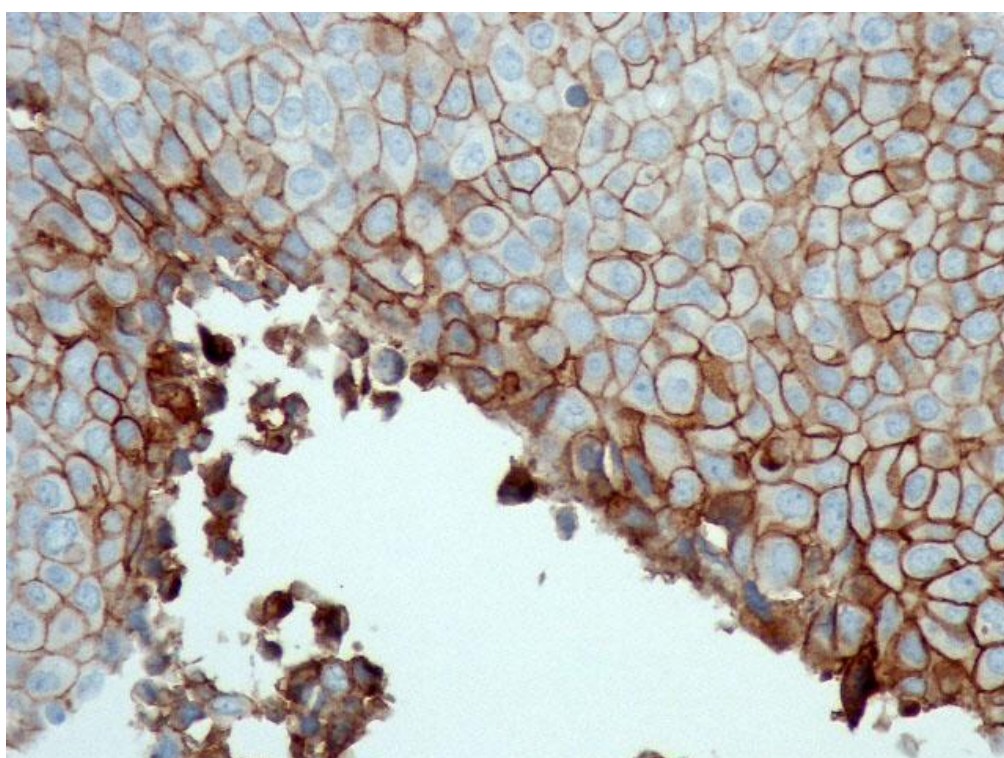
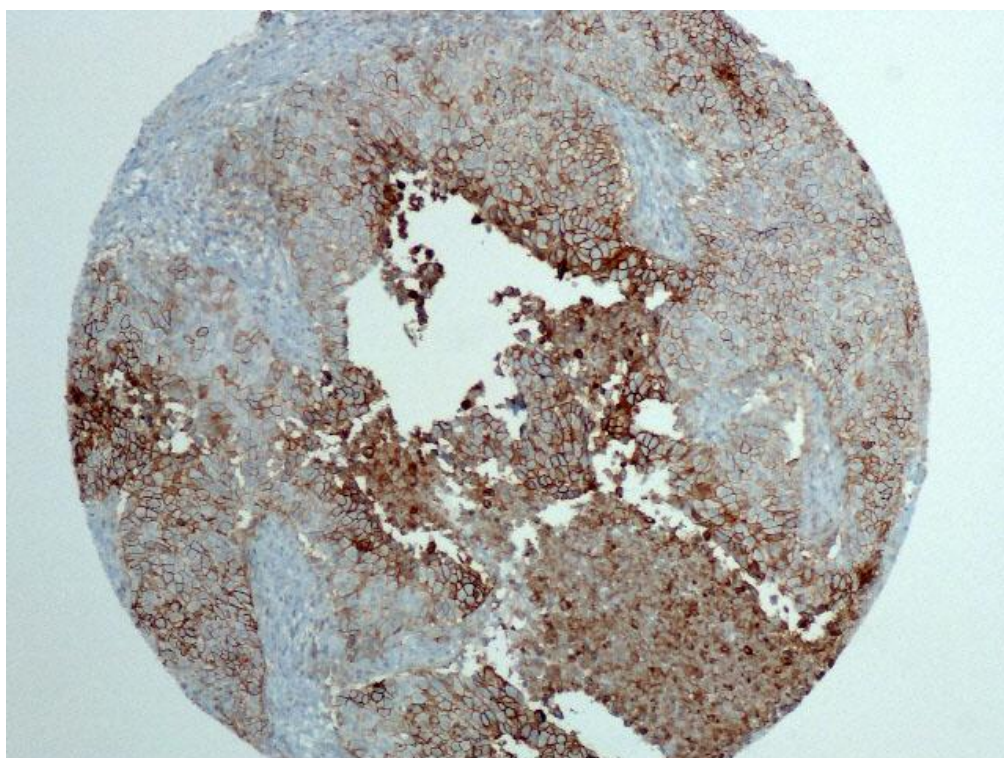


Figure 16. IHC de MCT4 (X100 en haut, X400 en bas), marquage membranaire des cellules tumorales; marquage maximal proche des zones les plus hypoxiques (nécrotiques)

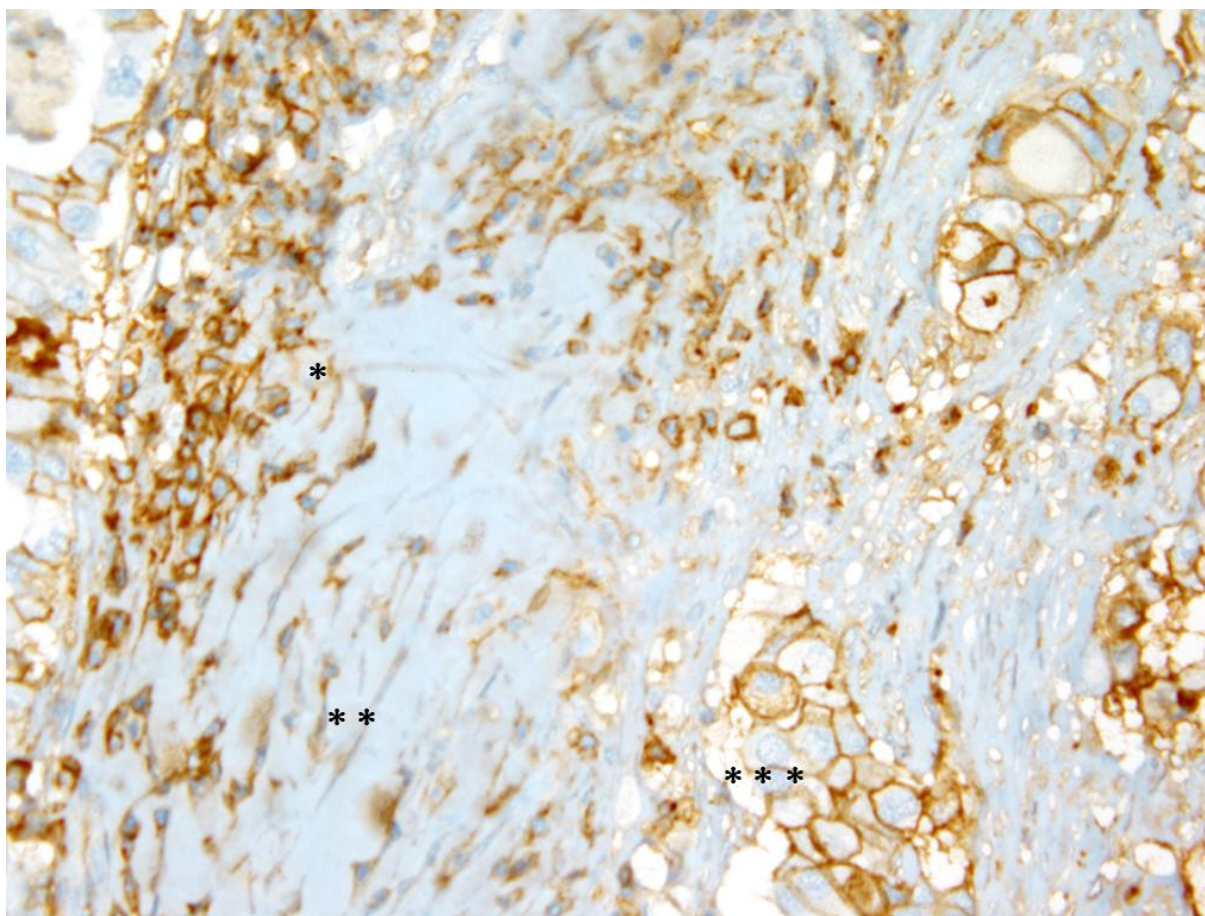


Figure 17. IHC de MCT4 (X400: marquage lymphocytaire (), fibroblastique (**) ou tumorale (***)*

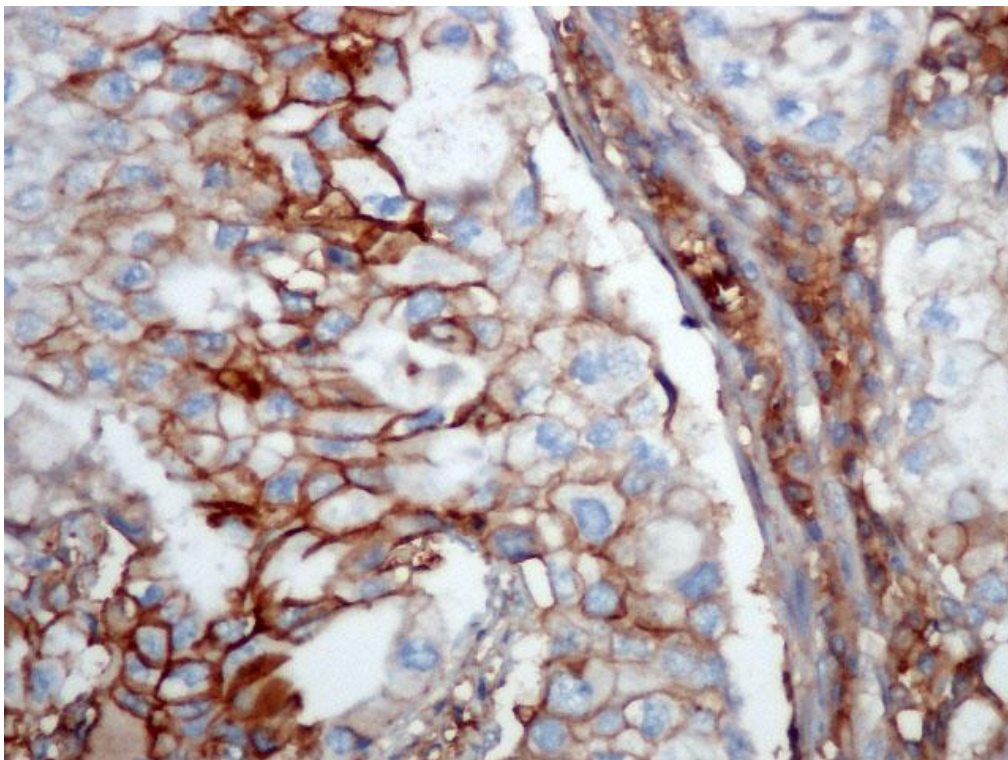
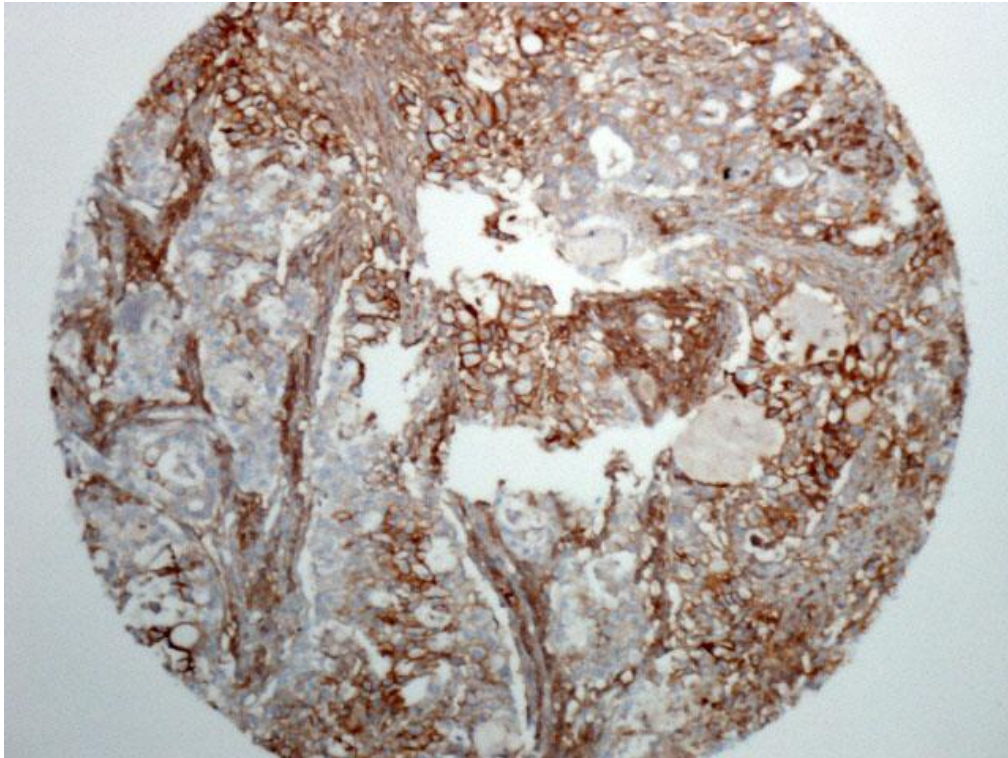


Figure 18. IHC de Basigine (X100 en haut, X400 en bas), marquage membranaire des cellules tumorales (mais aussi de quelques cellules du stroma)

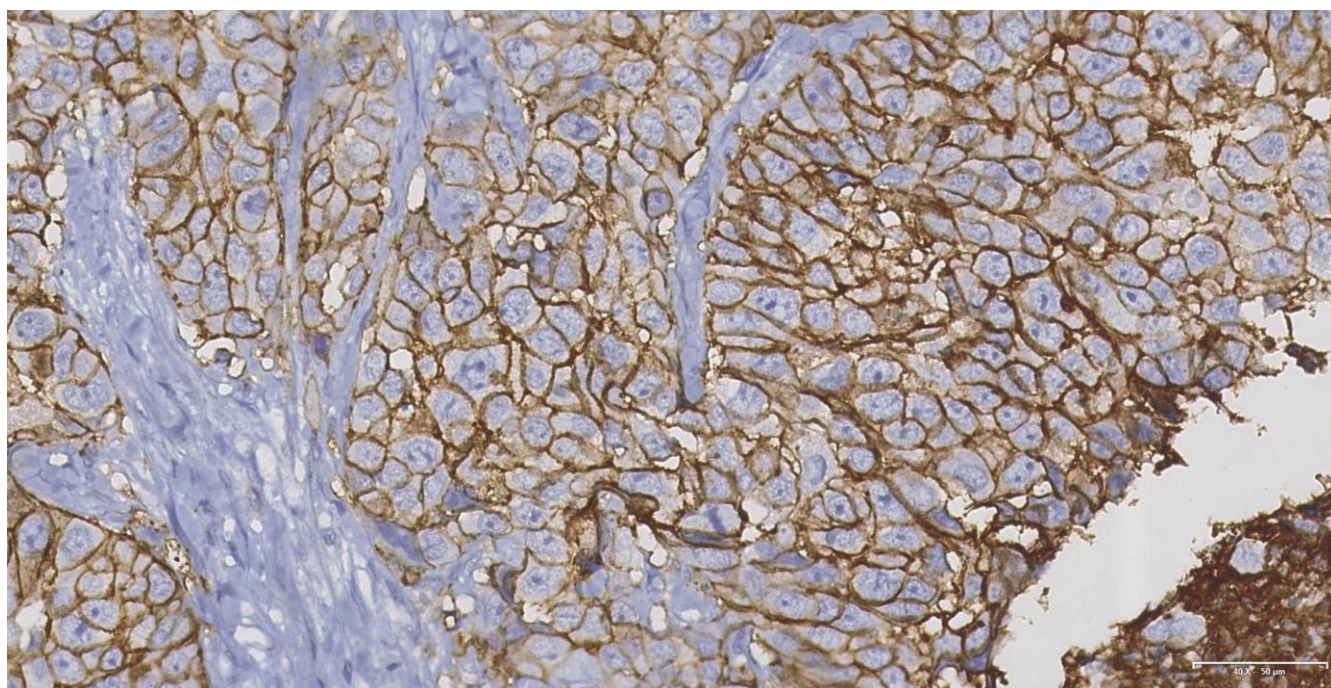
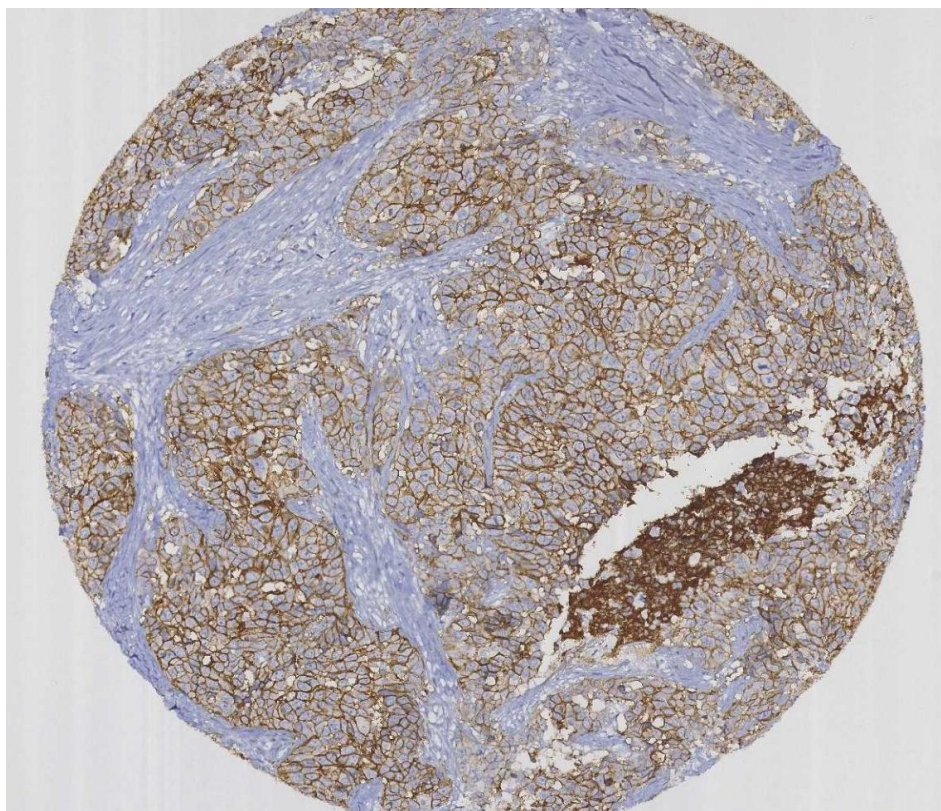


Figure 19. LAT-1, expression membranaire (X100 en haut, X400 en bas)

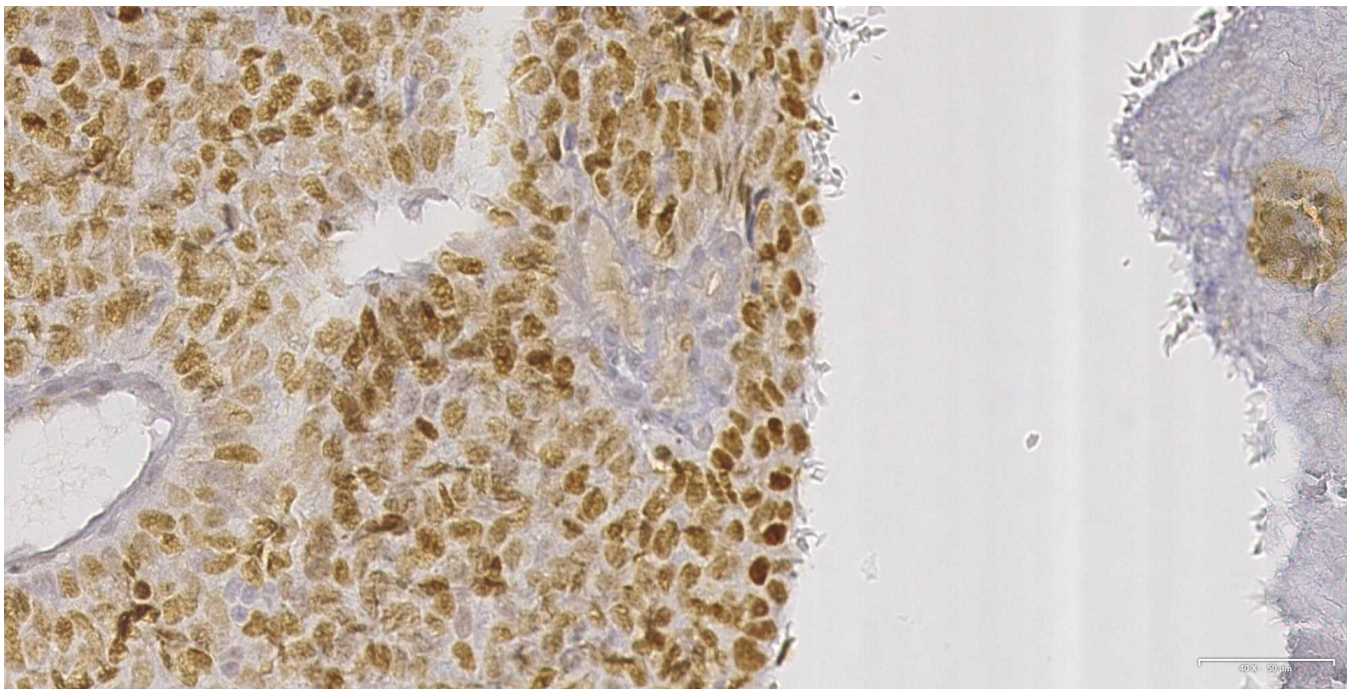
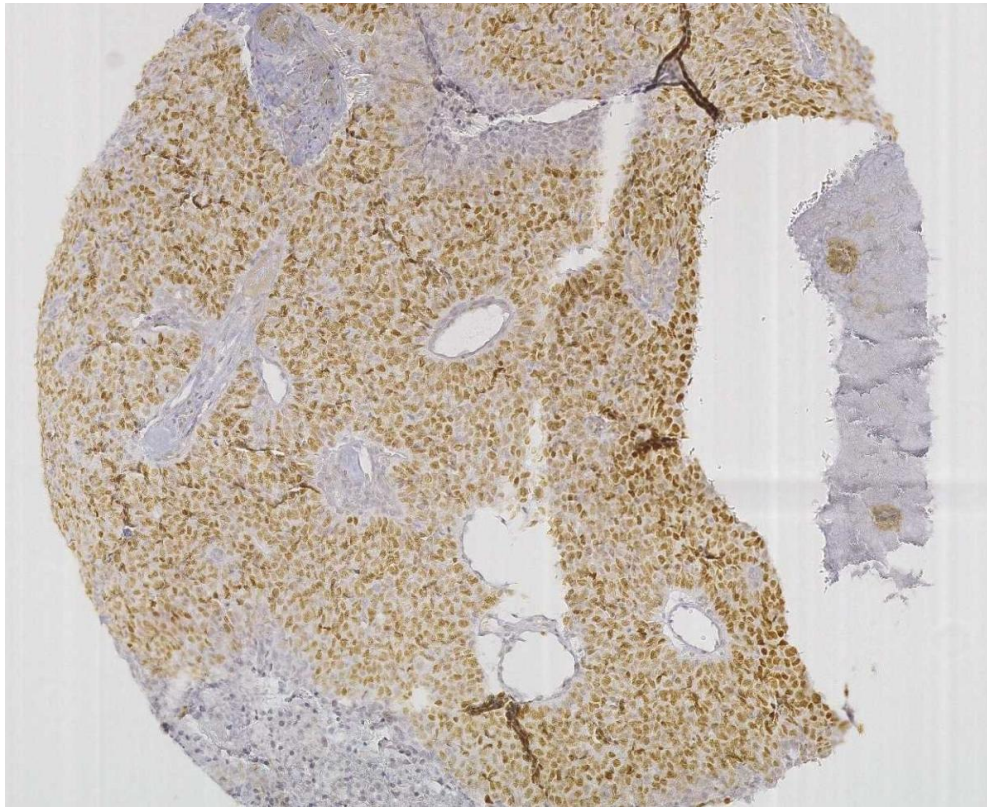


Figure 20. C-Myc, marquage nucléaire (X100 en haut, X400 en bas)

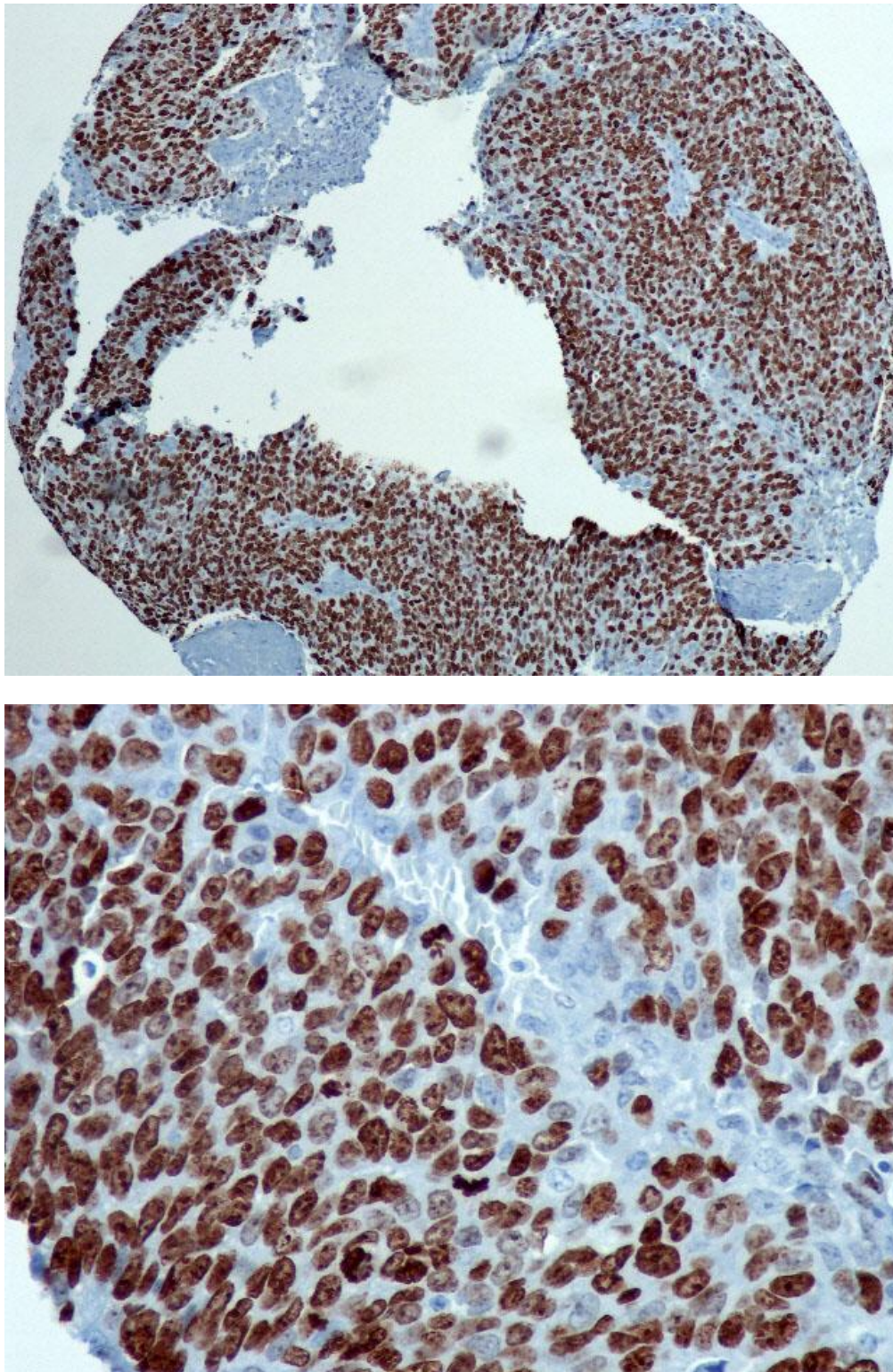


Figure 21. Ki-67, marquage nucléaire (X100 en haut, X400 en bas)

4.1.2. Survies et facteurs pronostiques de SSRM et de SP

Avec un suivi médian de 73 mois (3-173), 49 patientes ont présenté une rechute dont 40 rechutes métastatiques, et 25 rechutes locorégionales. 34 patientes sont décédées dont 31 à cause du cancer. Les taux de survie sans rechute (SSR), sans rechute locorégionale (SSRL), sans rechute métastatique (SSRM) et de survie spécifique (SP) à 5 ans étaient respectivement de 71.1%, 84.6%, 73.9% et 82.8%.

Les facteurs pronostiques de SSRM et de SP sont résumé dans le tableau 8.

Tableau 8. Facteurs pronostiques de survie, analyse Log-Rank (taux de survie à 5 ans)				
	SSRM	p	SP	p
Stade pT				
pT1	83.9%	<0.001	91.5%	0.001
pT2 à 4	59.7%		70.9%	
Stade N				
pN -	82.2%	<0.001	91.2%	0.001
pN +	57.1%		66.3%	
MCT4				
Tumoral strict	58.4%	0.006	77.9%	0.07
Tumoral et stromal	84.1%		84.0%	
Stromal strict	77.4%		86.8%	
Négatif	80.0%		89.8%	
MCT4				
Tumoral strict	58.4%	0.001	77.9%	0.009
Autres	80.7%		86.3%	
LDH-A				
Faible/négatif	100%	0.19	100%	0.24
Moyen/fort	72.8%		82.1%	

Concernant les facteurs suivants, aucun n'était pronostique ($p > 0.1$): âge au diagnostic (cut-off 50 ans), grade SBR (I-II vs III), Ki-67 (cut-off 30%), chimiothérapie (oui/non), radiothérapie, (oui/non), MCT1 (positif/négatif), GLUT1 (faible-nul/moyen-fort), CAIX (positif/négatif), Basigine (positif/négatif), LAT-1 (positif/négatif) et C-myc (positif/négatif). A noter qu'aucune tumeur négative pour la fixation de LDH-A n'a présenté de rechute ($n=5$) sans significativité statistique étant donné la rareté de l'évènement.

Les facteurs pronostic indépendants en analyse multivariée étaient les suivants (les variables MCT4 et LDH tumoral strict vs autres ont été choisis au lieu des variables composites étant donné la faible effectif des différents sous-groupes):

- SSRM: taille tumorale ($p=0.002$; Hazard Ratio (HR) 0.34 [0.17-0.67])
envahissement ganglionnaire ($p=0.002$; HR 0.35 [0.18-0.67])
MCT4 tumoral strict ($p=0.003$; HR 0.35 [0.18-0.67])
- SP: taille tumorale ($p=0.006$; HR 0.33 [0.15-0.73])
envahissement ganglionnaire ($p=0.004$; HR 0.33 [0.16-0.71])
MCT4 tumoral strict ($p=0.04$; HR 0.46 [0.22-0.97])

Les Figures 22 et 23 représentent les courbes des survie sans récidence métastatique des cancers TNEG selon le statut MCT4.

Le tableau 9 décrit le grade SBR, le statut Ki-67 et la taille tumorale selon les marqueurs glycolytiques. De manière générale les tumeurs TNEG exprimant les marqueurs glycolytiques ont un Ki-67 et un grade SBR plus élevé, mais la taille ou l'envahissement ganglionnaire n'étaient pas significativement différents entre les tumeurs glycolytiques et les tumeurs non glycolytiques.

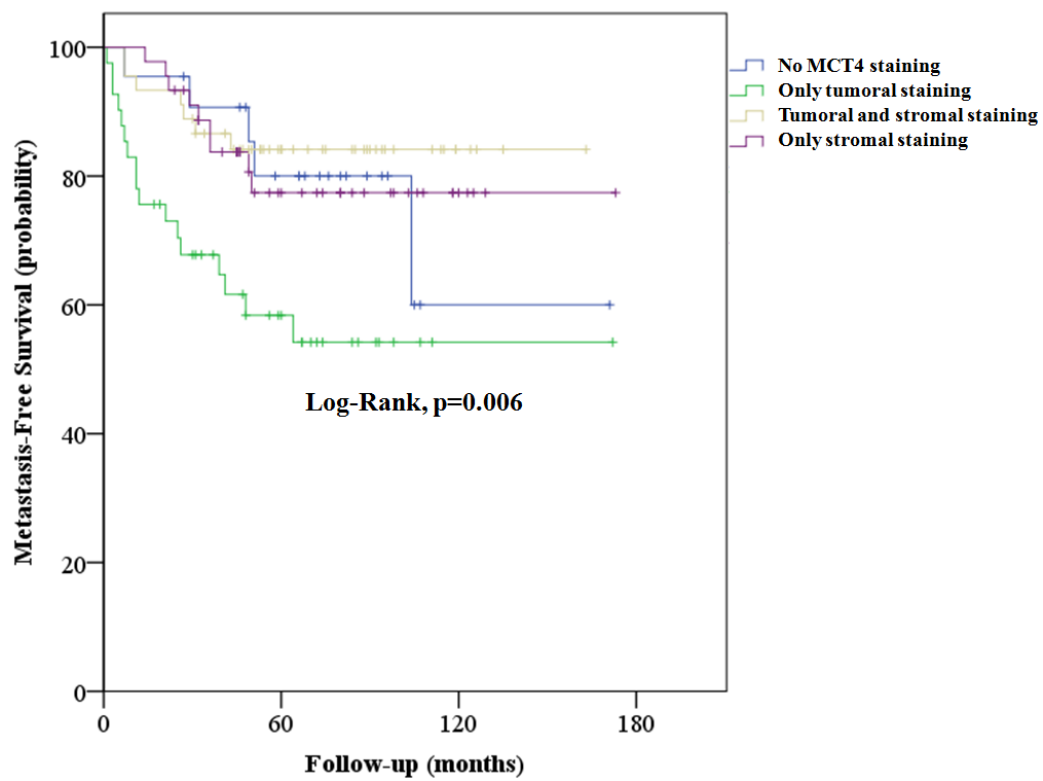


Figure 22. SSRM en fonction du statut MCT4 au niveau stromal et tumoral

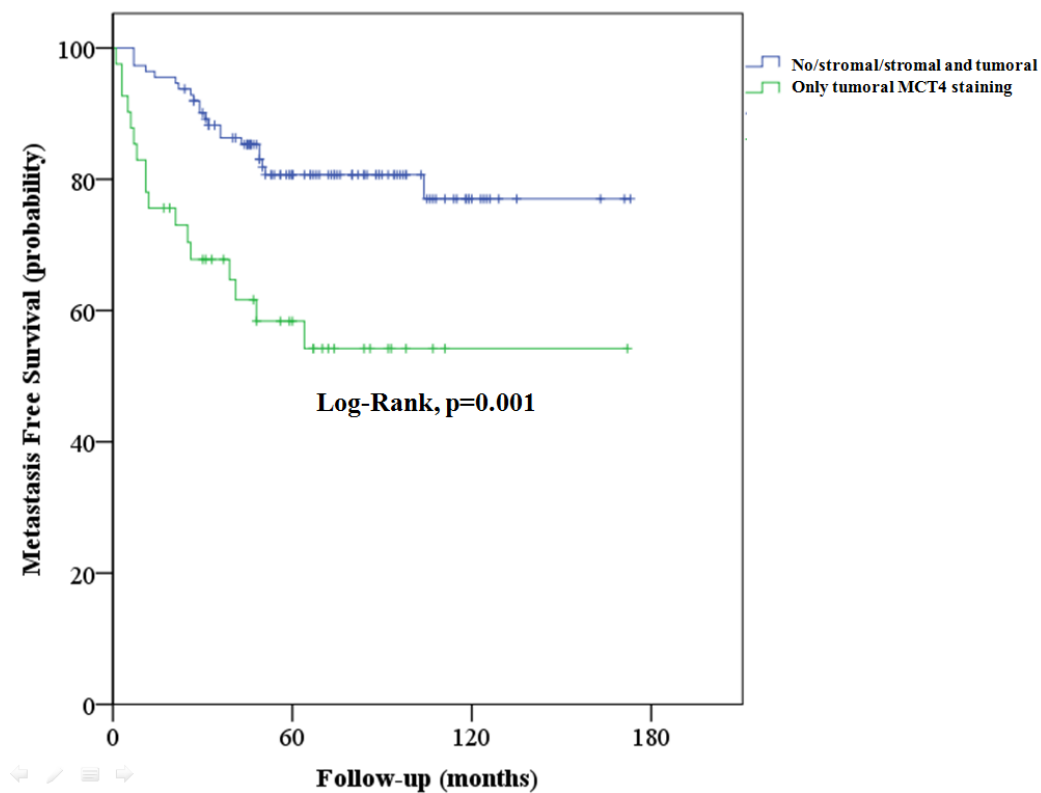


Figure 23. SSRM en fonction du statut MCT4 (marquage tumoral strict versus autres)

Tableau 9. Grade SBR, taille tumorale et taux de Ki-67 en fonction des marqueurs glycolytiques								
	Ki-67 ≥ 30%	p (Chi-2)	SBR III	p (Chi-2)	T > T1	p (Chi-2)	N+	p (Chi-2)
CA-IX								
Négatif	47.8%	0.4	98.4%	0.4	49.3%	0.2	35.2%	0.9
Positif	53.7%		96.3%		39.5%		34.9%	
GLUT-1								
Nul / Faible	24.5%	< 0.001	92.5%	0.009	39.7%	0.4	29.9%	0.09
Moyen / Fort	65.6%		100%		45.4%		43.1%	
LDH-A								
Nul / Faible	0%	0.04	100%	0.6	20%	0.2	40%	0.7
Moyen / Fort	52.1%		97.1%		45%		34.4%	
MCT1								
Absent	25.5%	< 0,001	92.3%	0.007	34.5%	0.06	39.7%	0.3
Présent	65.6%		100%		49.5%		32.3%	
MCT4								
Autre	48.6%	0.2	97.1%	0.8	40.5%	0.1	33.3%	0.5
Tumoral strict	60%		97.5%		52.3%		38.6%	
Basigine								
Absent	23.3%	0.001	93.3%	0.15	21.9%	0.06	31.3%	0.6
Présent	58.5%		98.2%		49.2%		36.1%	
LAT-1								
Absent	42.7%	0.02	94.9%	0.06	37.2%	0.06	37.2%	0.5
Présent	60.9%		100%		52.1%		32.4%	

4.2. Partie fondamentale

4.2.1. Détermination du statut hormonal et Her-2 des lignées de cancer du sein

Les lignées de cancer du sein utilisées sont réputées être TNEG (Hs578t, MDAMB-231) ou hormonosensibles (MCF7, T47D). Les figures 24 à 27 représentent le marquage RE, RP et Her-2 de ces lignées.

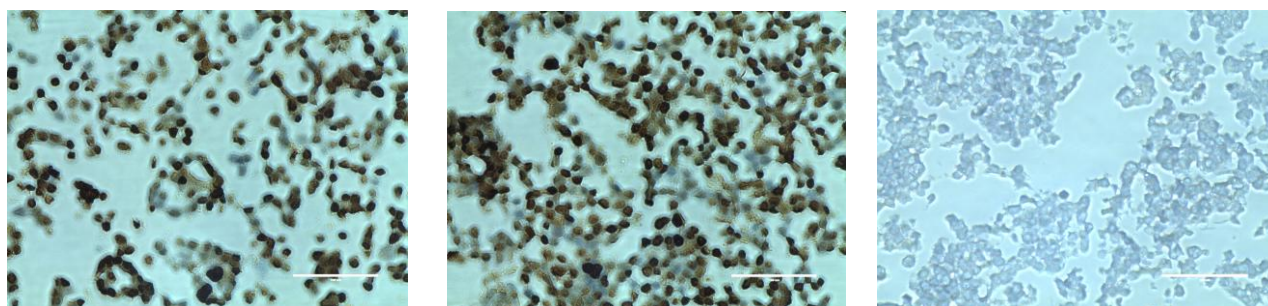


Figure 24. Marquage RE (gauche, positif, X400), RP (milieu, positif, X400) et Her-2 (négatif, droite X400) confirmant le statut RH+/Her-2 négatif de la lignée MCF7

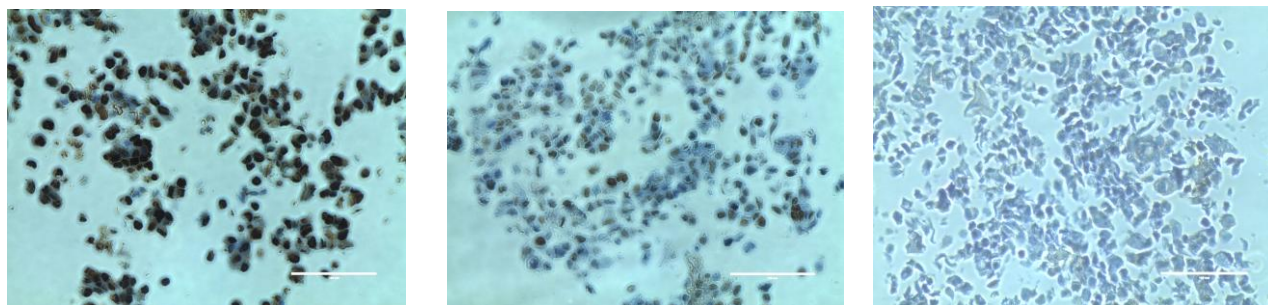


Figure 25. Marquage RE (gauche, positif, X400), RP (milieu, positif, X400) et Her-2 (négatif, droite X400) confirmant le statut RH+/Her-2 négatif de la lignée T47D

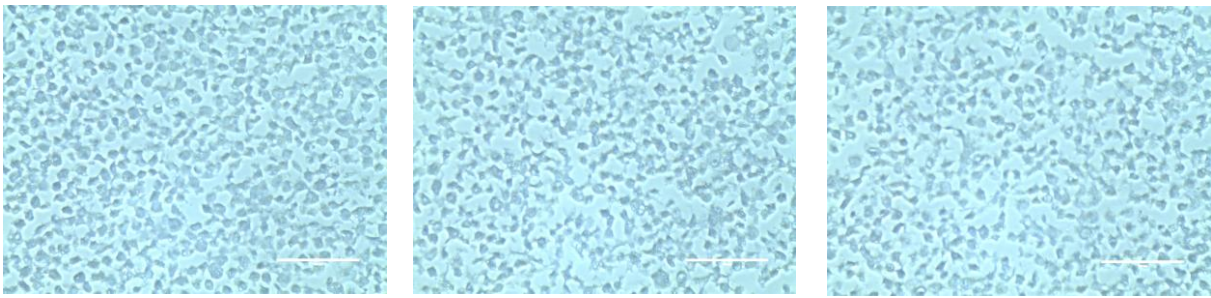


Figure 26. Marquage RE (gauche, nul, X400), RP (milieu, nul, X400) et Her-2 (nul, X400 droite) confirmant le statut TNEG de la lignée MDAMB-231

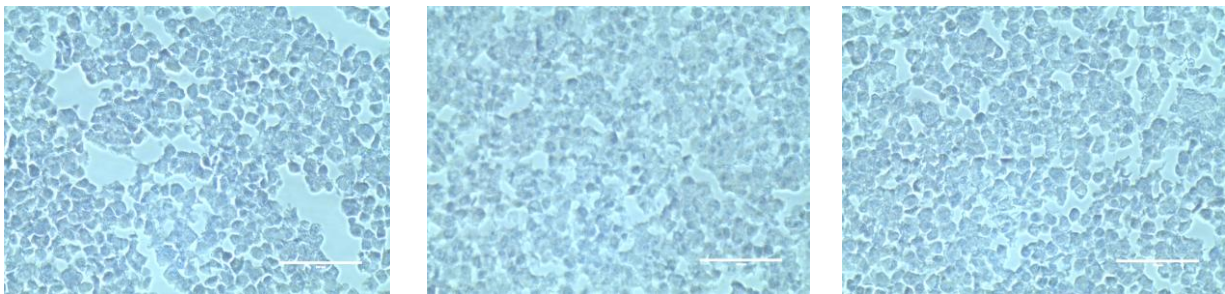


Figure 27. Marquage RE (gauche, nul, X400), RP (milieu, nul, X400) et Her-2 (droite nul, X400) confirmant le statut TNEG de la lignée Hs578t

4.2.2 In vitro les lignées TNEG sont plus glycolytiques que les lignées RH+

L'analyse de la consommation d'oxygène des lignées TNEG (Hs578t, MDAMB231) et RH+ (MCF7, T47D) montre que, pour un même nombre de cellules (50 000 cellules par puits), après introduction de glucose 5 mM (= condition plus physiologique) les 2 lignées RH+ voient leur consommation d'oxygène strictement stable, alors qu'une des 2 lignées TNEG (Hs578t) diminue sa consommation d'O₂, même en NORMOXIE, témoignant d'un shift vers la glycolyse fermentative (Figure 28A et B). A noter que la consommation d'O₂ de la 2^e lignée TNEG (MDAMB231, (Figure 28B)) ne baisse pas après introduction de glucose mais présente d'emblée la consommation la plus basse. L'oligomycine (1 μ M) est un inhibiteur puissant du complexe V de la chaîne respiratoire (ATP synthase) obligeant ainsi la cellule à produire la quasi totalité de son ATP à partir de la glycolyse (conversion du pyruvate

en lactate) reflétant donc ainsi le maximum de capacité de glycolyse fermentative et de production d'acide lactique.

Après introduction du glucose puis de l'oligomycine toutes les lignées présentent une diminution de la consommation d'oxygène, avec toutefois une amplitude plus importante pour les lignées RH⁺ (300→250 et 180→100 pour RH⁺, versus 100→50 et 60→40), témoignant d'une respiration de base plus élevée.

D'autre part, en conditions physiologiques (après introduction de glucose) la production extracellulaire d'acide lactique (ECAR) est plus importante pour les lignées TNEG que les lignées RH⁺ (10 et 26 versus 6 et 11, Figure 29A et B). De façon remarquable aucune des 2 lignées TNEG ne voit sa production d'acides augmenter après inhibition de la respiration (oligomycine, Figure 29B), contrairement aux 2 lignées RH⁺ (Figure 29A), ce qui signifie que les lignées TNEG utilisent le potentiel glycolytique maximal nécessitant un apport de glucose conséquent d'où l'« addiction » au glucose de ces cellules

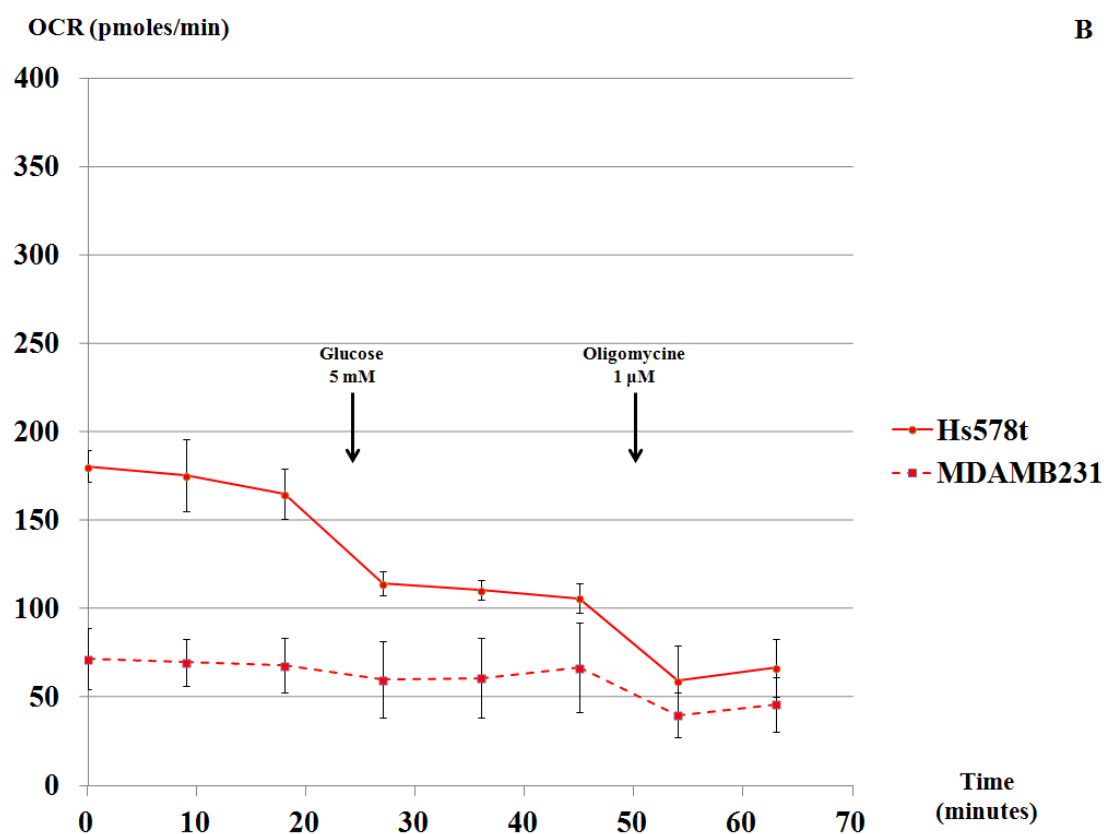
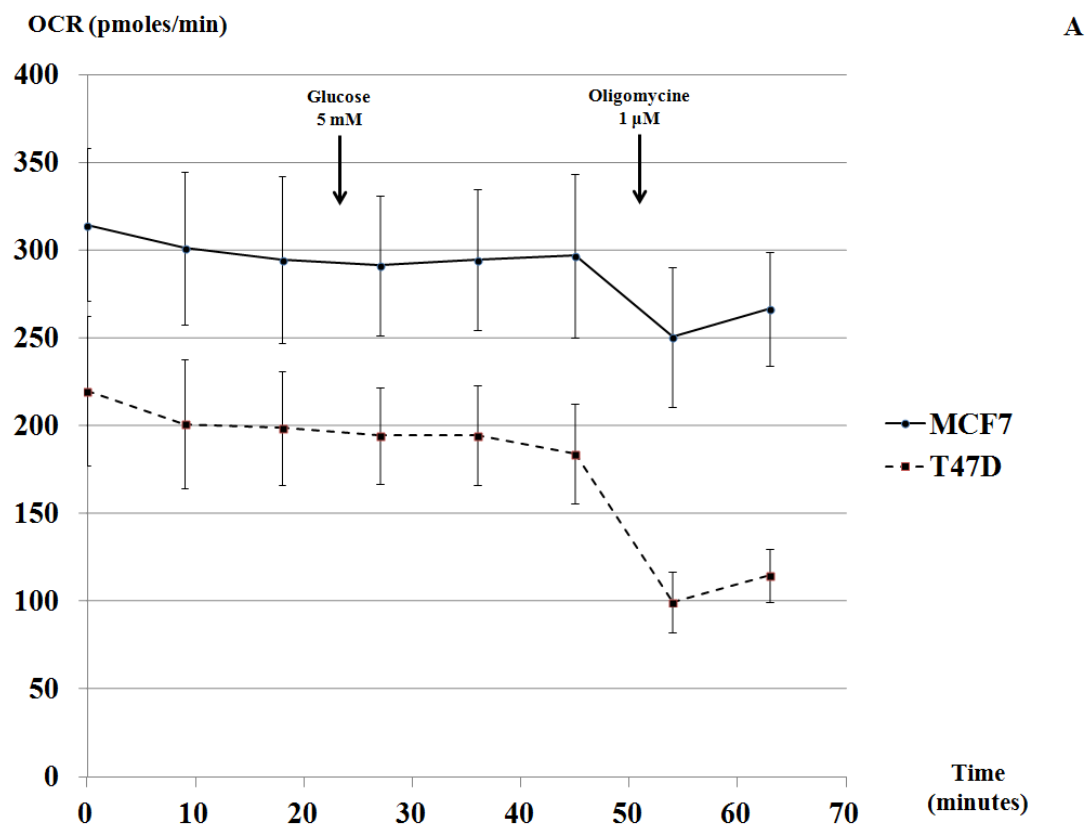


Figure 28. Consommation d'oxygène (OCR) pour les lignées RH+ (A), TNEG (B), sans, puis avec glucose (condition physiologique), puis avec inhibition complète de la respiration (oligomycine) (chaque point correspond à un triplicate).

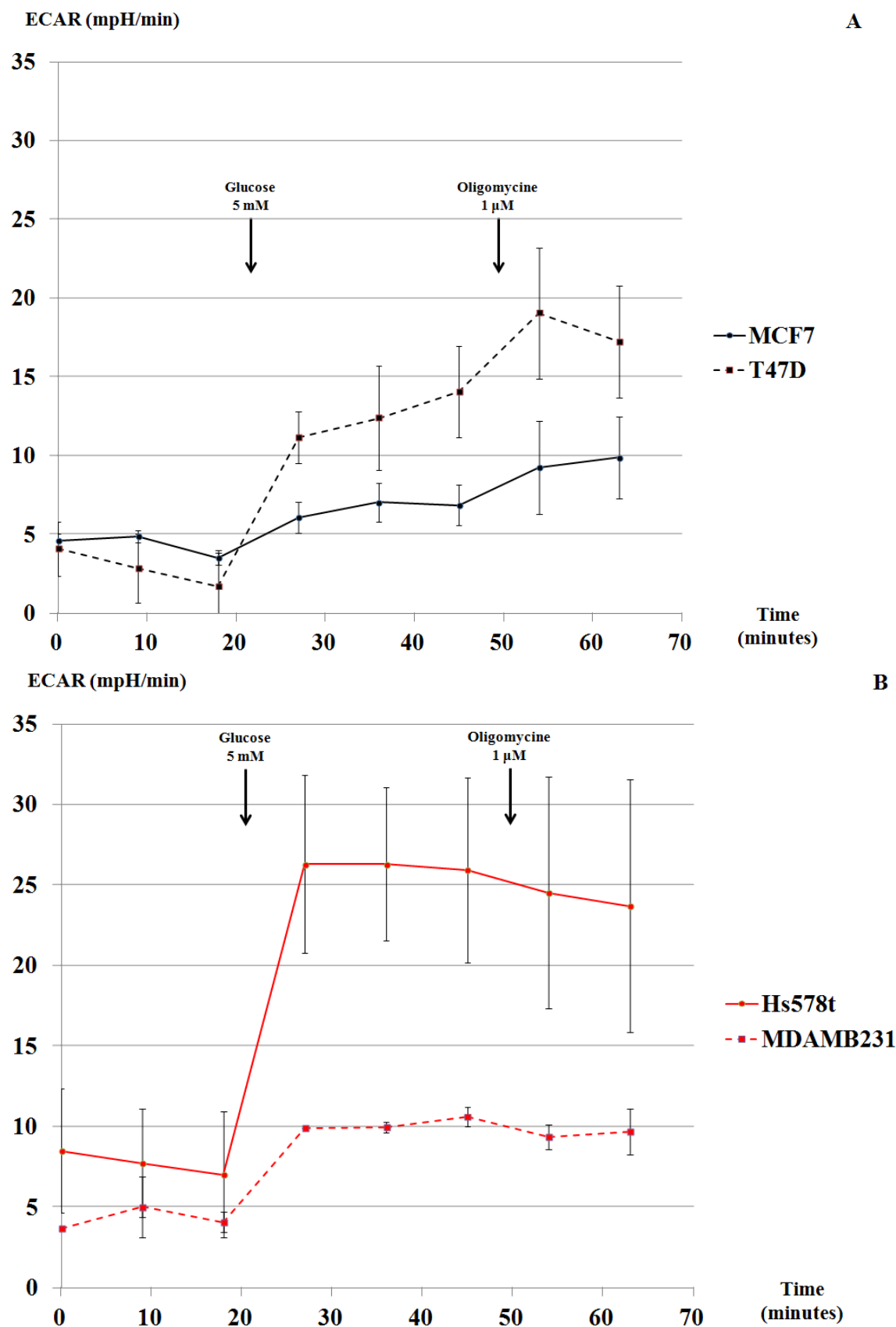


Figure 29. Production extracellulaire d'acide (ECAR) pour les lignées RH+ (A), TNEG (B), sans, puis avec glucose (condition physiologique), puis avec inhibition complète de la respiration (oligomycine) (chaque point correspond à un triplicata).

4.2.3. L'inhibition seule de MCT1 sur les lignées TNEG n'a peu ou pas d'impact antiprolifératif

Le caractère glycolytique des lignées TNEG in vitro montre une certaine dépendance au glucose, ainsi qu'aux mécanismes d'épuration de ses déchets comme les MCTs qui peuvent être proposés comme cible afin de diminuer les capacités de prolifération par acidification intracellulaire.

En conditions de clonogénicité (1000 cellules J1; fixation GIEMSA à J7 en normoxie et J10 en hypoxie) l'utilisation de l'inhibiteur de MCT1 (300 nM, développé par Astrazeneca, AR-C155858 ⁷⁶) n'avait aucun effet antiprolifératif évident, que ce soit pour la lignée Hs578t (Figure 30) ou la lignée MDAMB231 (Figure 31) avec même un effet proprolifératif en particulier pour la lignée MDAMB231.

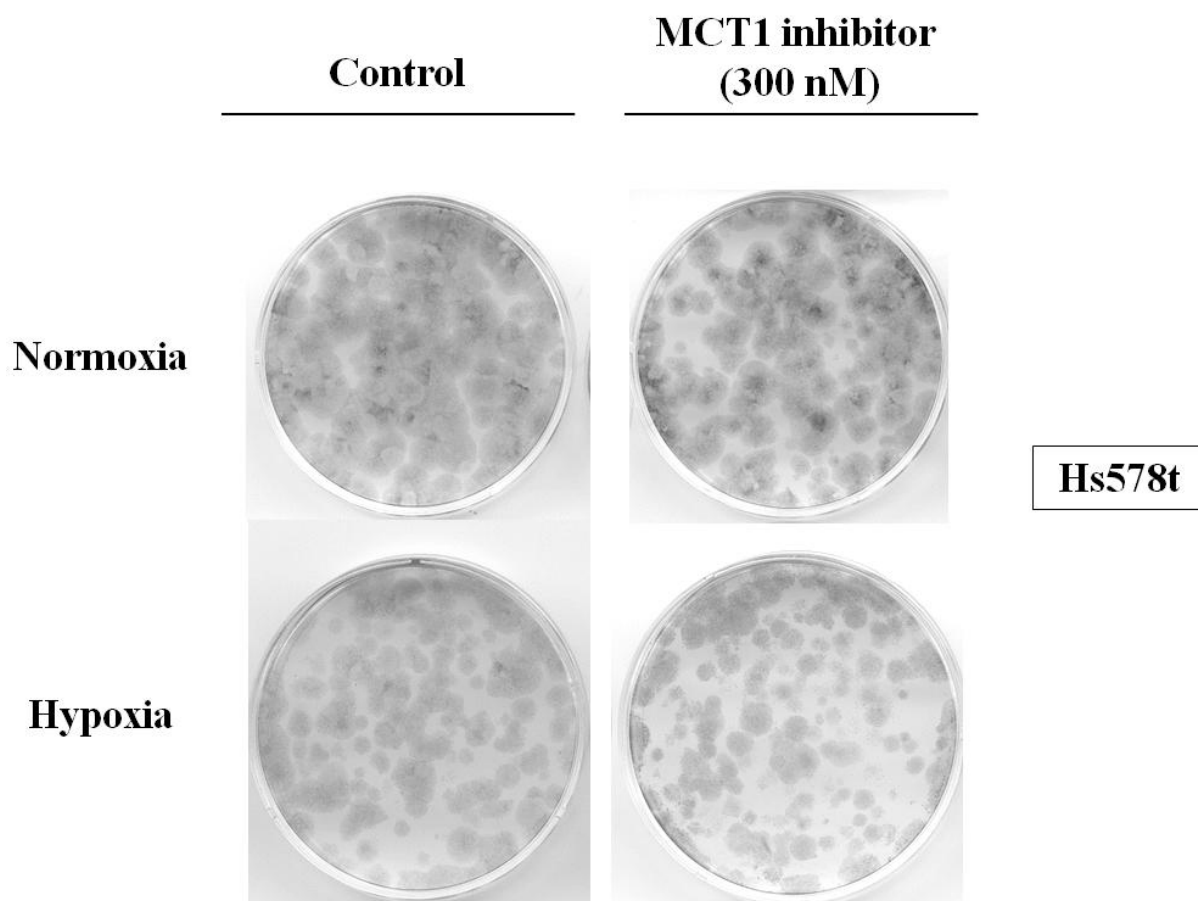


Figure 30. Clonogénicité de cellules de cancer du sein TNEG Hs578t (1000 cellulesensemencées, changement milieu avec inhibiteur à J3 après 2 jours en hypoxie, pour la condition hypoxique; à J1 pour la condition normoxique)

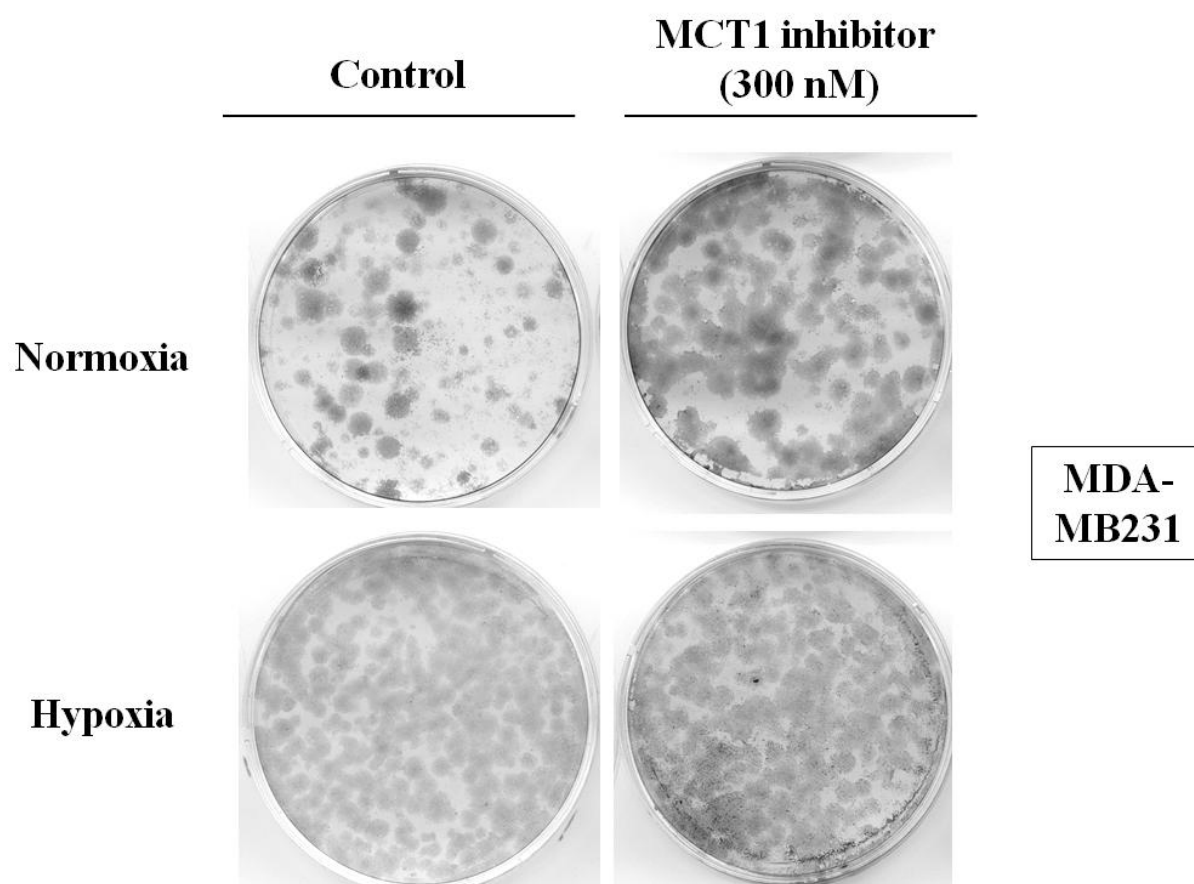
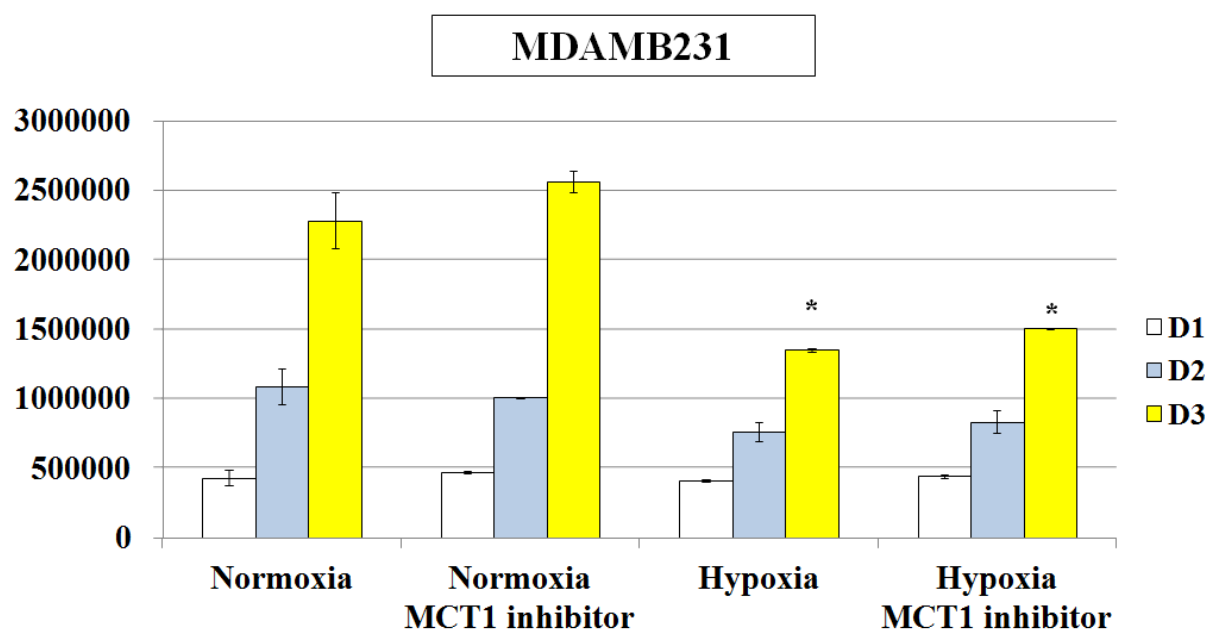


Figure 31. Clonogénicité de cellules de cancer du sein TNEG MDAMB231 (1000 cellulesensemencées, changement milieu avec inhibiteur à J3 après 2 jours en hypoxie, pour la condition hypoxique; à J1 pour la condition normoxique)

En condition de croissance exponentielle le comptage du nombre de cellulesensemencées dans des plaques 6 puits (75 000 cellules par puits), montre la même tendance pour les 2 lignées TNEG avec même pour la lignée MDAMB231, un effet proprolifératif de l'inhibiteur en hypoxie (Figure 32). Pour la lignée Hs578t il existe peut-être un effet anti-prolifératif en hypoxie, mais non significatif ($p=0,1$, test T Student).

A



B

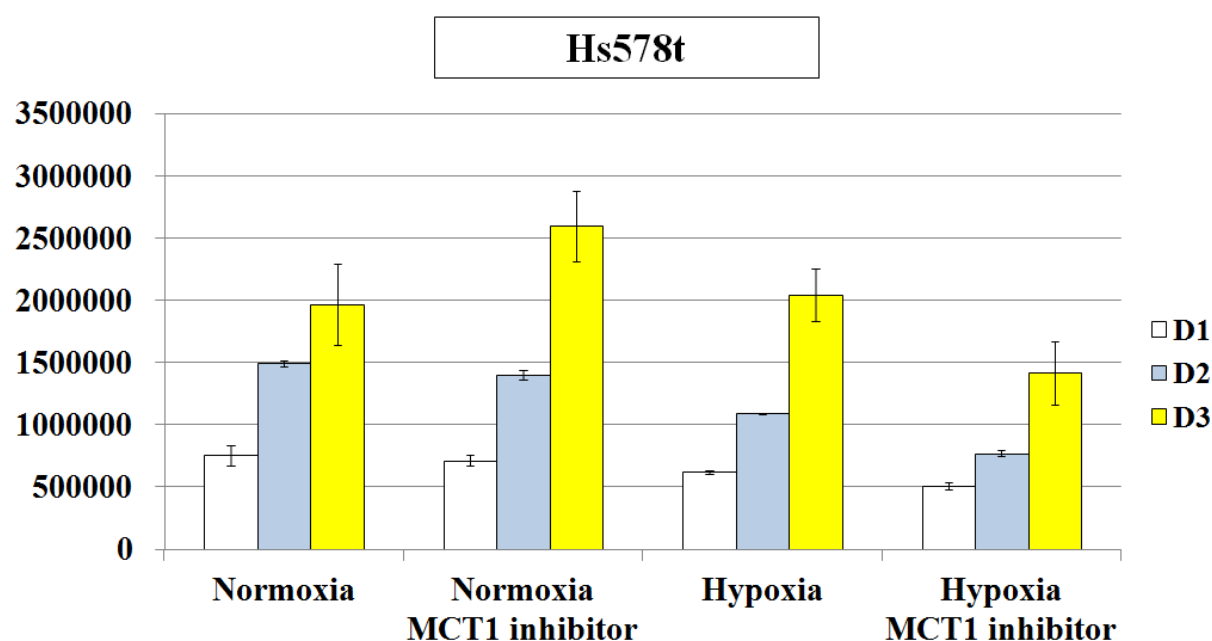


Figure 32. Comptage de cellules des lignées TNEG MDAMB231 (A) et Hs578t (B) mis en culture (75 000 cellules par puits) en normoxie/hypoxie, avec ou sans inhibiteur de MCT1 (300 nM) à J1, J2 et J3 (D1 à 3) (* différence significative entre ces 2 valeurs, $p=0,005$, Test-T).

L'analyse de la production extracellulaire d'acides (ECAR) en Seahorse montre toutefois une diminution rapide de l'ECAR après introduction de l'inhibiteur dans les 2 lignées (Figure 33), mais de façon beaucoup plus prononcée dans la lignée Hs578t pouvant peut-être expliquer l'effet plus prononcé de l'inhibiteur dans la lignée Hs578t.

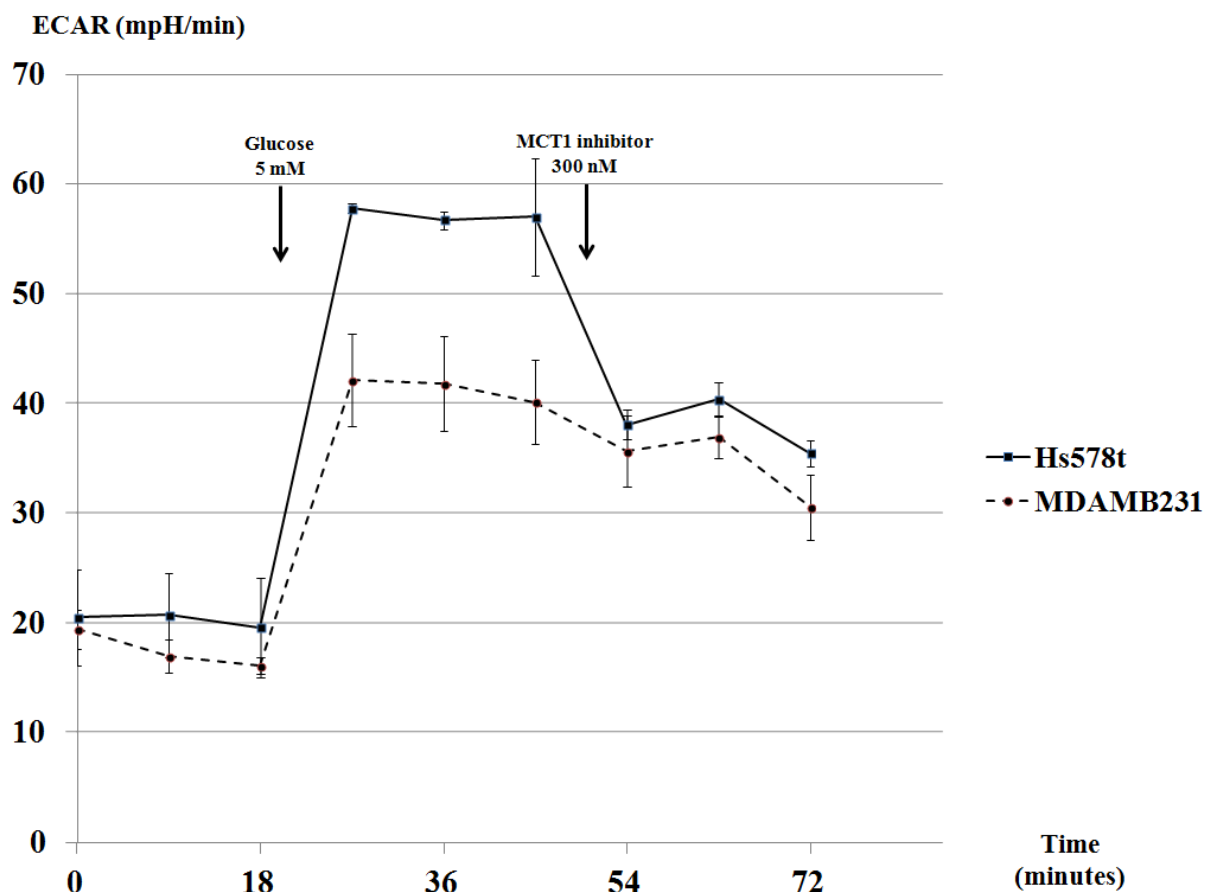


Figure 33. Analyse de la production extracellulaire d'acides (ECAR) des lignées TNEG exposées à un inhibiteur de MCT1 (300 nM).

4.2.4. La sous-expression de MCT4 est associée à une réduction de la prolifération des cellules TNEG Hs578t

L'autre protéine d'épuration du lactate, MCT4 pourrait également être une cible intéressante dans les lignées TNEG devant leur comportement très glycolytique, et ce d'autant qu'il s'agit du transporteur exclusif du lactate, induit sous hypoxie, et qu'il a été retrouvé comme facteur de mauvais pronostic indépendant dans la présente étude.

Puisque l'inhibiteur de MCT4 caractérisé par Astrazeneca n'est pas encore disponible,

nous avons tenté par technique de Zinc Finger Nucléases (ZFN) de déléter le gène MCT4 des 2 lignées TNEG MDAMB231 et Hs578t comme expliqué dans matériel et méthodes (chapitre 3.2.4). Pour la lignée MDAMB231, aucune cellule sélectionnée par le FACS n'a pu survivre dans les conditions de clonage extrême que représente l'ensemencement de cellule unique dans les puits des plaques 96 puits. Aucun clone n'a donc pu être obtenu pour la lignée MDAMB231. Pour la lignée Hs578t 3 clones (16, 21, 122) sur plus de 100 analysés ont pu être identifiés répondant au test de survie (MCT1 inhibiteur + oligomycine). En effet un double blocage de l'export d'acide lactique (MCT1/4) associé à une inhibition totale de la chaîne respiratoire (oligomycine) entraîne une mort cellulaire sous 24-48h (Figure 34).

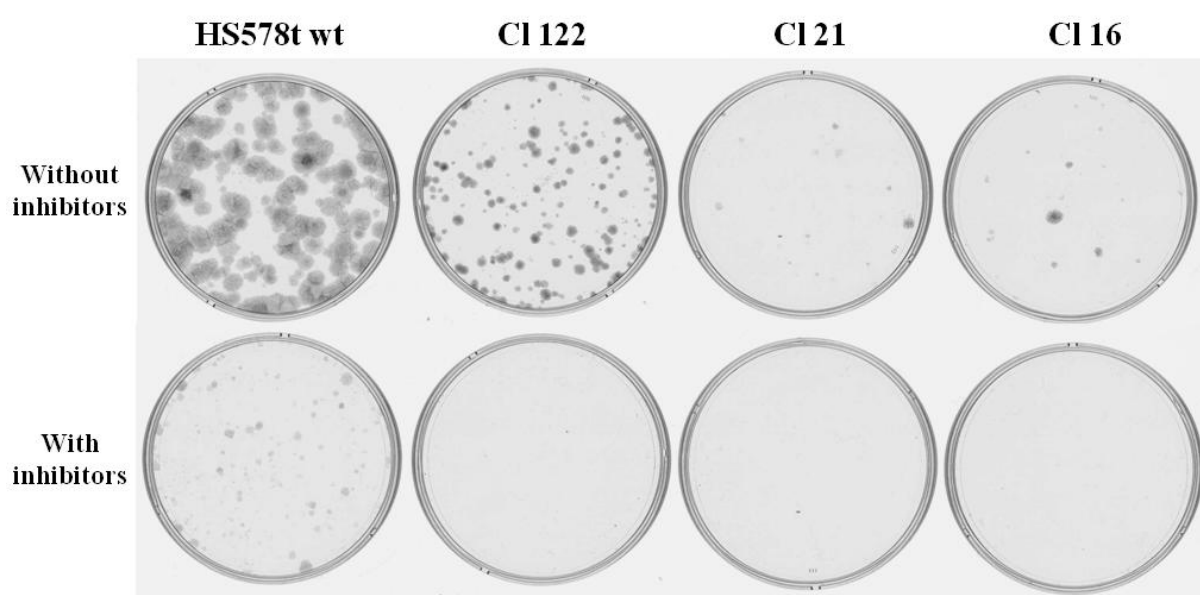


Figure 34. Clonogénicité (700 cellules ensemencées J1) de la lignée Hs578t wild type (Hs578t wt) des clones 16, 21 et 122, avec (en haut) et sans inhibition (en bas) de MCT1 (par inhibiteur de MCT1 300 nM) et de la chaîne respiratoire mitochondriale (oligomycine 1 μ M).

En condition de clonogénicité l'ensemble des clones présentait une prolifération nettement réduite par rapport à la lignée sauvage (Figure 34). Les clones 16 et 21 avaient une prolifération spontanée nettement réduite ne permettant la réalisation d'autres expériences, alors que le clone 122 pouvait toujours proliférer (Figure 34, haut). Nous avons donc choisi le clone 122 pour les expériences suivantes.

L'analyse par western blot a montré une nette réduction de l'expression de MCT4 dans le clone 122 comparé à la lignée parentale (WT) (Figure 35). L'exposition à l'hypoxie ne montre

pas d'élévation du niveau d'expression de MCT4, elle-même faible chez le WT. Néanmoins en comparaison avec les niveaux de Basigine, il ressort que l'expression de MCT4 dans ce clone 122 est nettement réduite.

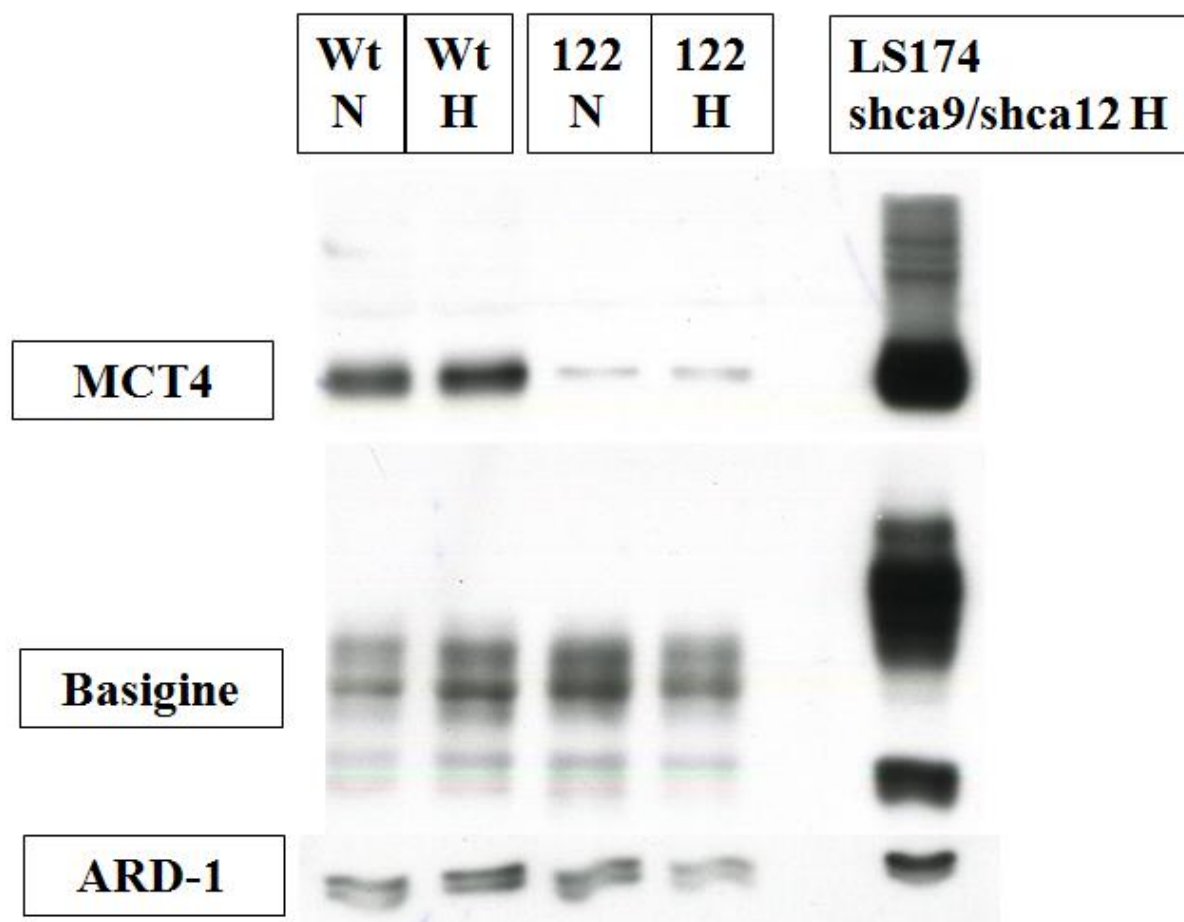


Figure 35. Western blot d'extraits protidiques de cellules de Hs578t wt (WT) et Hs578t clone 122 (122) cultivées en normoxie (N) ou hypoxie (H, 48 heures); ARD1 = contrôle de charge, LS174 shca9/ca12 = lignée de carcinome du colon avec invalidation par shRNA de ca9 et ca12, utilisé pour contrôle positif de l'expression des protéines.

Le séquençage du gène *MCT4* dans le clone 122 comparativement à la lignée sauvage type n'a pas montré de différence. Il est possible qu'il y ait un nombre trop important de copies du gène pour que celui-ci soit entièrement délété ou que le ZFN n'est pas à l'origine de la baisse d'expression de MCT4.

L'analyse Seahorse du taux de glycolyse par l'ECAR (ajout de 5mM glucose) montre une réduction d'environ 25% pour le clone 122 en comparaison avec la lignée Hs578t sauvage (Figure 36). Cette réduction peut être liée au plus faible taux de croissance du clone 122 lui-même expliqué par la réduction de l'expression de MCT4. Par contre comparé à la lignée parentale, l'inhibiteur de MCT1 abolit totalement le taux de glycolyse dans la forme mutée du clone 122 (Figure 36). Ce résultat permet de rendre compte de l'extrême sensibilité du clone 122 à la combinaison d'inhibiteurs (MCT1i + oligomycine) utilisée pour la caractérisation du phénotype MCT4-null.

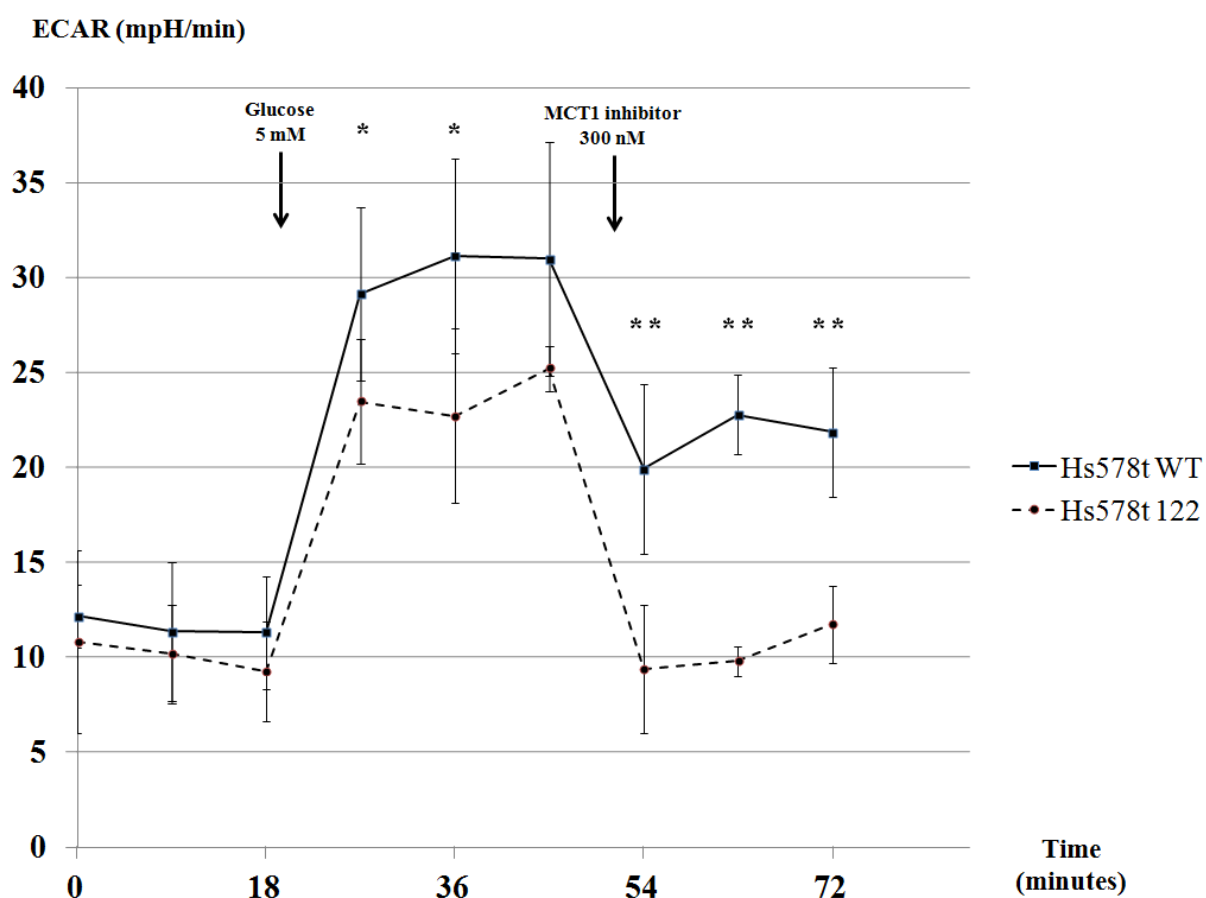


Figure 36. Analyse par Seahorse de la production extracellulaire d'acides (ECAR) dans les lignées Hs578 wt et Hs578 cl122; * = limite significativité entre les 2 points ($p=0,1$), ** = différence significative entre les 2 points ($p<0,05$), test T de Student.

L'inhibition pharmacologique de MCT1 permet, contrairement à la souche wild type, d'obtenir un effet anti-prolifératif à la fois en clonogénicité (Figure 37) et en condition de croissance exponentielle (Figure 38).

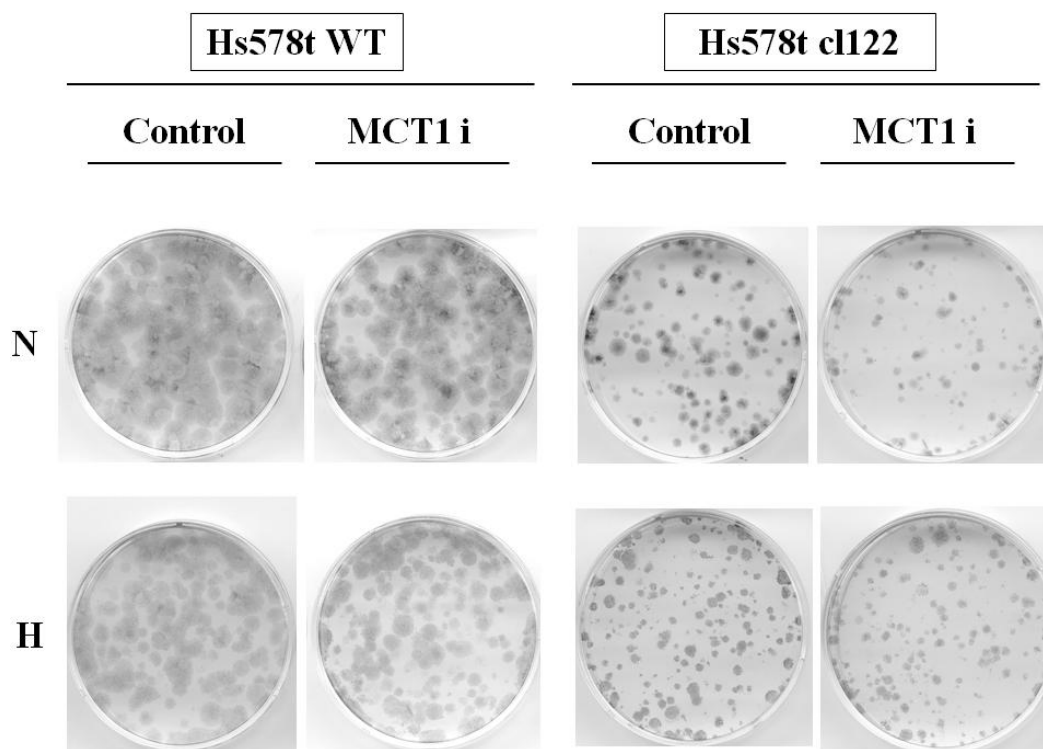


Figure 37. Clonogénicité de cellules de cancer du sein TNEG Hs578t WT et Hs578t cl122 (1000 cellulesensemencées, changement milieu avec inhibiteur à J3 après 2 jours en hypoxie, pour la condition hypoxique; à J1 pour la condition normoxique)

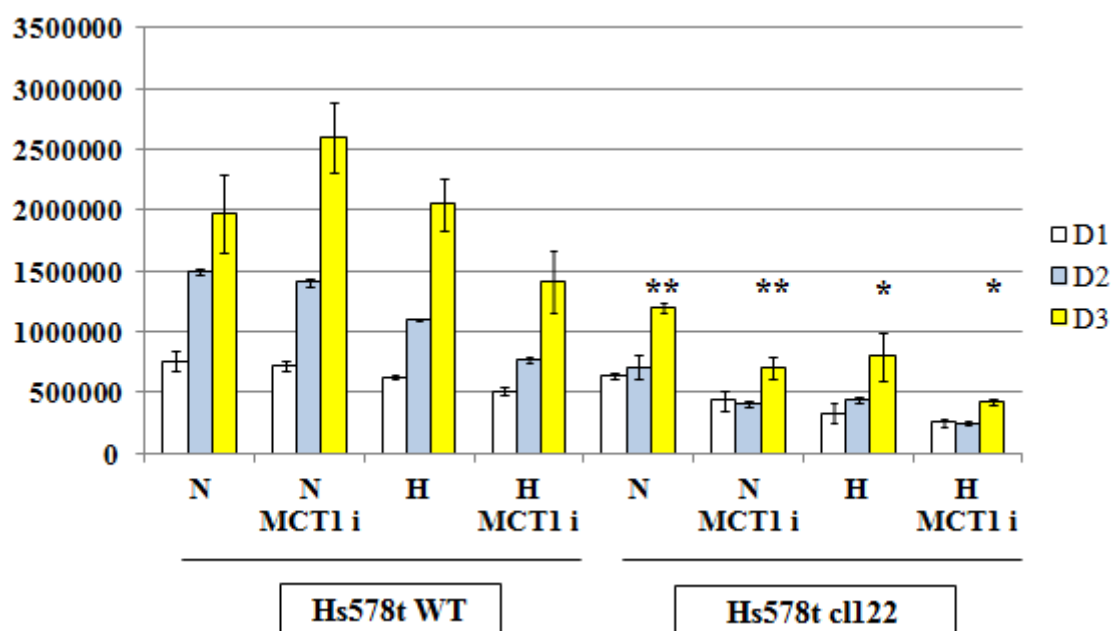


Figure 38. Comptage de cellules des lignées Hs578t WT et cl122 mis en culture (75 000 cellules par puits) en normoxie/hypoxie, avec ou sans inhibiteur de MCT1 (300 nM) à J1, J2 et J3 (D1 à 3) (* tendance significativité, $p=0,1$; ** différence significative entre ces valeurs, $p<0,05$, Test-T)

4.2.5. L'inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire permet de réduire la prolifération des lignées TNEG in vitro

Afin d'exploiter l'inhibition des MCTs il faut forcer les cellules tumorales à n'utiliser que la glycolyse anaérobie. Ceci peut-être réalisé par un traitement à l'oligomycine mais elle ne peut être utilisée en clinique (toxicité). Il existe aussi la metformine, et surtout la phenformine qui sont des inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ainsi l'effet de l'inhibition a en effet permis d'entraîner une chute drastique des capacités de clonogénicité de la lignée Hs578t cl122 (Figure 39, haut) ainsi que de ses capacités de prolifération en condition de croissance exponentielle (Figure 39, bas), que ce soit en normoxie ou hypoxie.

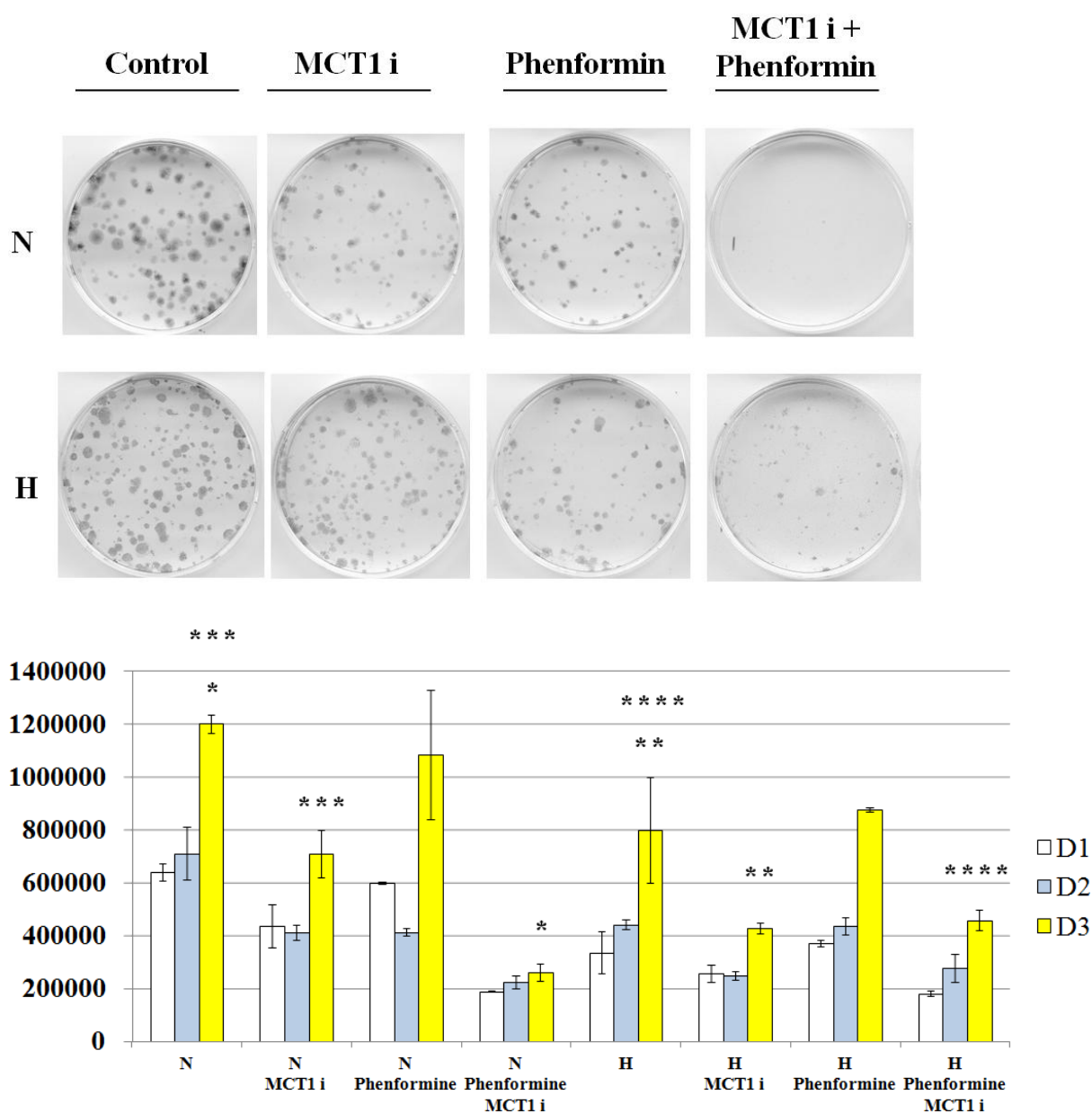


Figure 39. Haut, clonogénicité (après ensemencement de 1000 cellules, changement de milieu à J3 en hypoxie et J1 en normoxie), Bas, comptage de cellules en croissance exponentielle (ensemencement de 75 000 cellules par puits) de la lignée Hs578t cl122 exposée à l'inhibition de MCT1, avec ou sans phenformine, en normoxie ou hypoxie (les différences significatives sont notées par des astérisques)

L'effet antiprolifératif maximal a été obtenu par le triple ciblage de MCT1, MCT4 et du complexe I de la chaîne respiratoire. Concernant la lignée MDAMB231, seulement un double ciblage a pu être réalisé, de MCT1 et de la chaîne respiratoire par phenformine montrant un effet antiprolifératif uniquement en normoxie par la phenformine, l'inhibiteur de MCT1 semblant au contraire augmenter les capacités de prolifération de cette lignée (Figure 40).

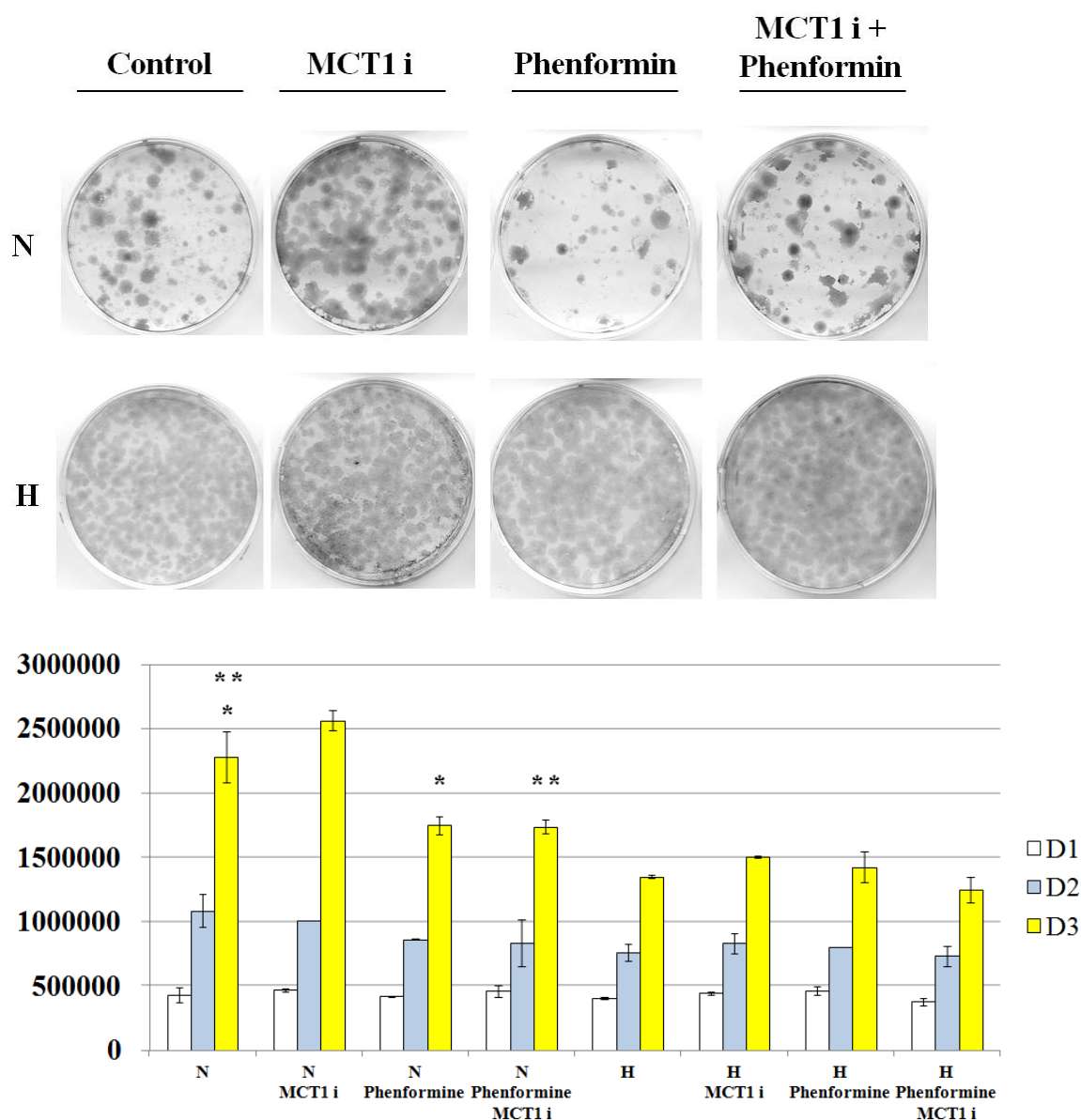


Figure 40. Haut, clonogénicité (après ensemencement de 1000 cellules, changement de milieu à J3 en hypoxie et J1 en normoxie), Bas, comptage de cellules en croissance exponentielle (ensemencement de 75 000 cellules par puits) de la lignée MDAMB231 exposée à l'inhibition de MCT1, avec ou sans phenformine, en normoxie ou hypoxie (astérisques = tendance à significativité avec $p=0,1$)

5. Discussion

Les données du PET-scanner au 18 -FDG suggéraient que les cancers TNEG étaient hautement glycolytiques du fait d'une fixation systématique de ce marqueur dans 2 séries différentes^{54,73}. Les résultats de la thèse du Dr Trastour permettaient de conforter cette observation avec une surexpression de l'ensemble des protéines glycolytiques par rapport aux autres sous-groupes (RH+ et Her-2), avec un facteur 2 à 3. Les résultats de notre travail clinique et fondamental ont confirmé tous les 2 ces données avec un marquage des protéines glycolytiques de l'axe hypoxique dans 54.1% (CAIX) à 96.8% (LDH-A) selon le marquage. Comme couramment observé les tumeurs TNEG étaient de très haut grade avec 77.6% de grade SBR III et un taux de Ki-67 $\geq 30\%$ de 51%. Les résultats in vitro ont montré à partir de 2 lignées TNEG comparées à 2 lignées RH+ que leur fonctionnement était d'emblée en glycolyse anaérobie maximale puisque, en particulier, l'oligomycine ne s'accompagnait pas d'une augmentation de l'ECAR des 2 lignées TNEG, alors que pour les 2 lignées RH+ la glycolyse anaérobie pouvait être augmentée par l'oligomycine démontrant ainsi qu'elles ne l'utilisent pas le maximum de leur potentiel 'glycolyse' (Figure 29).

Le suivi médian était de 73 mois (7.9 ans) permettant de recueillir la plupart des événements métastatiques et des décès spécifiques. L'âge médian de 62 ans était plus élevé qu'attendu étant donné que les médianes habituellement observées sont en deçà (aux alentours de 50 ans^{77,78}). L'âge plus élevé des patients de la Côte d'Azur pourrait expliquer ce phénomène. Les facteurs pronostiques classiques comme pT et pN étaient retrouvées comme facteurs indépendants de SSRM et SP (tableaux 8 et 9). Les autres facteurs classiques n'étaient pas retrouvés, notamment le SBR, l'âge au diagnostic ou le Ki-67, comme précédemment observé dans d'autres séries, notamment pour le Ki-67 et le score mitotique⁷⁸. Concernant les marqueurs glycolytiques/hypoxiques aucun n'était pronostic sauf le marquage MCT4 qui était associé à un plus mauvais pronostic (pour SSRM et SP) surtout lorsqu'il était exprimé au niveau des cellules tumorales mais sans expression stromale (taux de SSRM à 5 ans de 58.4% versus 80.7%, $p=0.001$, Figure 22, 23). En analyse multivariée ce marqueur était également reconnu comme facteur pronostic indépendant de SSRM et SP tout comme l'avait démontré le Dr Trastour (tableau 2 et 3). Dans la thèse du Dr Trastour l'analyse de sous-groupe montrait que ce marquage ne semblait pas pronostic (Figure 9) dans les TNEG mais en augmentant le nombre de patientes il s'avère qu'il s'agissait uniquement d'un manque de puissance statistique. Contrairement à l'analyse du Dr Trastour la présence des marqueurs

glycolytiques dans les cancers TNEG n'était pas forcément associée à une taille tumorale ou un envahissement ganglionnaire plus importants mais par contre les tumeurs glycolytiques présentaient un taux de prolifération ($Ki67 \geq 30\%$) et un grade SBR III plus élevés (tableau 9). Cela confirme que les tumeurs qui prolifèrent beaucoup doivent surexprimer les marqueurs de glycolyse afin de métaboliser le glucose et de détoxifier la cellule des métabolites acides issus du glucose. Ces tumeurs présentent donc également, du fait du grade SBR III plus élevé, une dédifférenciation et des anomalies de morphologie du noyau plus importantes et donc un potentiel métastatique plus important. En particulier le statut MCT4 semble jouer un rôle prépondérant dans l'agressivité tumorale ayant été identifié comme un marqueur pronostic indépendant de SSRM et de SP. MCT4 est la protéine dédiée à la détoxification de l'acide lactique produit en permanence et en large excès lors d'une glycolyse exacerbée³; elle est très efficace et spécifique pour remplir ce rôle bien que son affinité pour le lactate soit plus faible que celle de MCT1. Par contre MCT1 transporte le lactate et le pyruvate qui sont des solutions métaboliques intéressantes pour le métabolisme oxydatif par re-capture. L'export de pyruvate par MCT1 est au contraire défavorable sur le plan énergétique (équivalent d'une perte en ATP). Cela nous permet de comprendre pourquoi l'inhibition de MCT1 peut stimuler la croissance de plusieurs types de cellules cancéreuses dont les TNEG de cette étude (observations de l'équipe). Bloquer l'export de pyruvate est un avantage sur le plan énergétique. Une cellule de cancer TNEG qui exporte donc efficacement l'acide lactique est a priori capable de mieux résister aux carences nutritionnelles et donc de métastaser plus facilement à partir d'un microenvironnement acide. Etant donné que son expression est corrélée au degré d'hypoxie et au degré d'activation des master gènes comme HIF-1³ et c-Myc³⁷ on comprend que les cellules ayant acquis une résistance dans les zones hypoxiques et pauvres en nutriments soient le plus apte à induire la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion tumorale. De manière plus directe, l'expression de MCT4 pourrait être corrélée à un enrichissement en cellules souches tumorales. Dans les glioblastomes il a en effet été décrit que la diminution de l'expression du gène *MCT4* s'associait à une diminution du nombre de cellules exprimant CD133 avec une réduction de 50-80% des capacité de prolifération des lignées tumorales in vitro et in vivo⁷⁹. De manière intéressante d'autres travaux ont montré qu'il existait en hypoxie, un enrichissement en cellules souches dans des lignées de cancer du sein, et dépendait de Hif-1 α , reliant ainsi la voie hypoxique aux cellules souches⁸⁰, et donc comme hypothèse sous-jacente, une implication probable de MCT4 dans leur fonctionnement. De même il a été observé que les cellules souches présentaient un taux de espèces réactives

oxygénées très bas, ce qui laisse supposer des mécanismes efficaces d'épuration d'acide comme pourrait être MCT4⁸¹. Les cellules souches tumorales sont résistantes aux traitements anti-tumoraux conventionnels comme la chimiothérapie et la radiothérapie peut-être via BMI1 qui est une protéine impliquée dans la résistance à l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse⁸². Une autre explication de l'agressivité des cellules surexprimant MCT4 pourrait être que l'alcalinisation accrue du milieu intracellulaire (augmentation du pH intracellulaire) est un facteur permettant de diminuer l'activité des chimiothérapies qui sont le plus souvent moins efficace à un pH alcalin^{3,83} (Figure 41 et 41 bis).

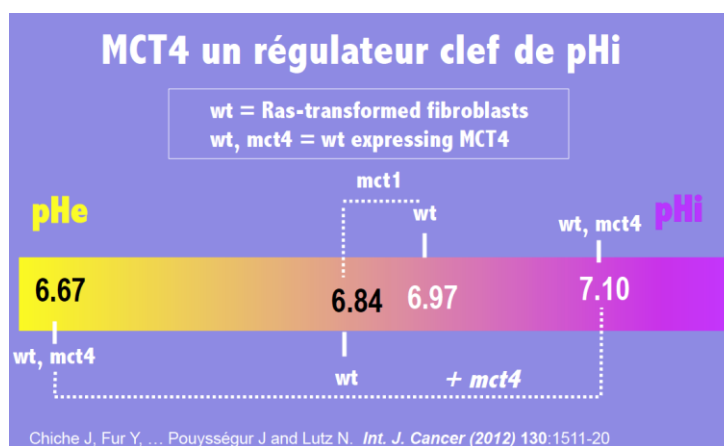


Figure 41. pH

extracellulaire (pHe) et intracellulaire (pHi) mesurés *in vivo* dans des xénogreffes de souris d'une lignée transformée de fibroblastes (CCL39) wild type exprimant MCT1 (wt, mct1), et dans la même lignée mais exprimant également MCT4 (wt, mct4; expression forcée de MCT4 par un vecteur pCI-neo-mct4); comparativement à la lignée n'exprimant pas MCT4, les variations entre pHi et pHe de la lignée exprimant MCT4 sont plus importantes avec un pHi bien plus élevé (7.1 vs 6.97) et un pHe bien plus bas (6.67 vs 6.84), grâce à l'expression de MCT4

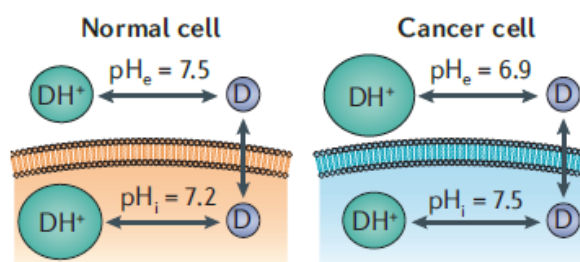


Figure 41 bis. Au niveau des cellules tumorales le gradient de pH au niveau membranaire est inversé avec un pH extracellulaire plus acide; les chimiothérapies (drug = D; exemple, la doxorubicine) sont majoritairement des bases faibles et vont au niveau extracellulaire se retrouver protonées (DH⁺) en plus grande quantité avec donc une forme neutre minoritaire; c'est la forme neutre qui traverse la membrane, ainsi, les drogues pénètrent moins les cellules tumorales⁸³

Aussi bien dans le travail du Dr Trastour que dans la cohorte des cancers TNEG l'impact pronostique de MCT4 était plus prononcé si les tumeurs n'exprimaient pas MCT4 au niveau du stroma. Dans le stroma, MCT4 pouvait être aussi bien exprimé par les lymphocytes ou les fibroblastes, suggérant que la présence de ces 2 types cellulaires pourrait être délétère pour la progression tumorale. De nombreuses études dans de très nombreux cancers ont en effet démontré que les lymphocytes infiltrant la tumeur (tumor infiltrated lymphocytes, = TIL, en particulier CD8) témoignaient d'une réponse immunitaire anti-tumorale aussi bien au niveau de la tumeur mammaire que les cellules qui auraient pu déjà avoir métastasé ⁸⁴. Dans le cancer du sein, une analyse a posteriori des lames HES des tumeurs de patientes incluses dans l'essai BIG 02-98 a montré de façon très remarquable que le sous-groupe TNEG présentait un pronostic plus favorable lorsqu'il existait un infiltrat lymphocytaire, avec pour chaque augmentation de 10% du taux de TIL, une réduction de 15% du risque de rechute ⁸⁵; ainsi les cancers médullaires qui constituent un sous-groupe de cancers TNEG extrêmement enrichis en TIL, présentent un pronostic très favorable ⁸⁶. Il se trouve que les lymphocytes, de manière générale expriment fortement les MCTs car sont hautement glycolytiques ⁸⁷, et parmi les nouveaux traitements immunosuppresseurs, des inhibiteurs de MCTs (MCT1 en particulier) sont en développement ⁸⁸. Le marquage MCT4 stromal pourrait donc refléter indirectement la présence de TIL et pourrait donc expliquer un pronostic plus favorable, même si la tumeur exprime MCT4.

Concernant les fibroblastes, il a été décrit que les fibroblastes humains de prostate saine présentait une capacité d'excrétion de l'acide lactique et une expression de MCT4 bien moindre que les fibroblastes présents dans le cancer de la prostate (Figure 42) ²². Dans cette même étude les fibroblastes sains qui étaient mis en coculture avec des cellules de cancer de prostate présentaient une nette augmentation de l'expression de MCT4 et de leur capacité à excréter l'acide lactique (switch vers un phénotype plus anaérobie), avec dans le même temps une réduction de ces mêmes capacités par les cellules cancéreuses (switch vers un phénotype plus aérobie). Il est possible qu'il se passe la même chose au sein des tumeurs mammaires exprimant MCT4 au niveau stromal avec pour conséquence une agressivité moindre des cellules cancéreuses. Pour corroborer cela une autre étude a montré que la présence d'un stroma riche était corrélée de façon indépendante à une meilleure survie sans rechute et survie globale dans les cancers du sein en général, et de manière encore plus prononcée dans les cancers TNEG ⁸⁹.

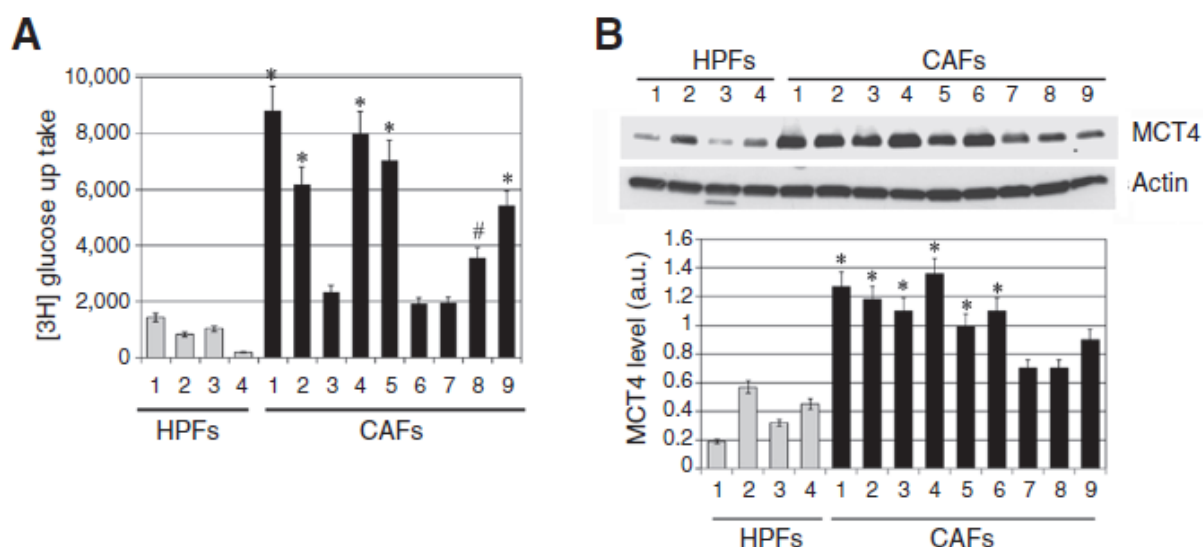


Figure 42. Uptake de glucose (A) et expression de MCT4 (B, protéine haut, ARNm bas) de fibroblastes humains prostatiques (HPFs) et de fibroblastes de cancers de prostate (CAFs) (A),

L'impact pronostique de MCT4 en cancérologie n'a pour l'instant pas beaucoup été étudié. L'expression de MCT1, MCT4 et GLUT-1 dans les cancers TNEG a déjà été rapportée comme plus fréquente dans les cancers TNEG que dans les autres cancers du sein, et leur expression a également été corrélée avec un grade SBR plus élevé⁹⁰⁻⁹². L'expression de MCT4 a déjà été rapportée comme de mauvais pronostic dans les adénocarcinomes bronchiques⁹³ ainsi que les carcinomes à cellules claires du rein⁹⁴. De manière surprenante l'équipe de Lisanti a trouvé des résultats inverses aux nôtres dans les cancers TNEG avec un impact favorable de l'expression de MCT4 tumoral et un impact pronostique défavorable de l'expression stromale de MCT4⁹⁵, ce qui va à l'encontre de l'ensemble de tous les autres résultats publiés et cités précédemment, et à l'inverse de l'impact pronostic de MCT4 retrouvé dans les 2 cohortes du Centre Antoine-Lacassagne. Il est possible que les résultats de l'équipe de Lisanti soient différents si on analysait de manière concomitante, et non séparée, l'expression du MCT4 stromal et du MCT4 tumoral.

A noter que l'expression de CAIX n'était pas corrélée au pronostic des cancers TNEG dans notre série, alors que notre équipe avait précédemment retrouvé ce facteur comme pronostic dans les cancers du sein en général³³. Les anhydrases carboniques permettent la détoxification du CO₂ c'est à dire de réguler le pH intracellulaire facilitant la respiration mitochondriale dont le CO₂ est le principal déchet. Puisque les cancers TNEG dépendent plutôt de la glycolyse anaérobie (Figure 29) et de l'export de l'acide lactique par les MCTs, il n'est pas étonnant que l'expression de CAIX ne soit pas pronostique comme cela a été

précédemment décrit dans une autre série de cancers TNEG⁹⁶. Nous n'avons pu tester l'impact pronostique d'HIF-1 α à cause de difficultés techniques pour réaliser l'immunohistochimie avec les anticorps commerciaux (épuisement de l'anticorps anti-HIF-1 α développé dans notre laboratoire, et décès du lapin qui le produisait). Puisque l'expression de MCT4, GLUT-1 et de très nombreux oncogènes dépend de HIF, nous aurions pu supposer qu'il pouvait refléter le pronostic des patientes avec un cancer du sein. La protéine LAT-1 qui transporte les acides aminés essentiels et la protéine LDH-A qui transforme le pyruvate en acide lactique n'avaient pas d'impact pronostic évident mais avaient une expression fréquente (LAT-1, 44.7%) voire systématique (LDH-A, 96.8%) montrant que les cancers TNEG ont un métabolisme énergétique exacerbé.

La présente étude rapporte les premiers résultats du ciblage spécifique du métabolisme glycolytique dans 2 lignées établies de cancers du sein TNEG. L'inhibition seule de MCT1 par un inhibiteur spécifique (AR-C155858⁷⁶) n'avait aucun effet évident sur 2 lignées TNEG (MDAMB231 et Hs578t) avec même un effet pro-prolifératif pour la lignée MDAMB231. L'invalidation génétique de MCT4 par la technique ZFN a l'avantage sur les shRNA d'opérer une suppression totale de l'activité. Alors que ce couple ZFN-MCT4 a très bien fonctionné dans notre équipe pour une lignée d'adénocarcinome colique la réduction de MCT4 sur la lignée Hs578t a été obtenue avec néanmoins une légère activité résiduelle. L'efficacité du ciblage de MCT4 (clone 122) combinée à l'inactivation pharmacologique de MCT1 est évidente dans la mesure de ECAR (Figure 36). Non seulement le taux de glycolyse est réduit dans le clone 122 déficient en MCT4, mais l'addition de l'inhibiteur MCT1 complète l'inhibition de la glycolyse par blocage complet de l'export d'acide lactique (Figure 36). On voit donc que pour cibler le taux de glycolyse et donc la croissance tumorale (Figures 37 et 38) en jouant sur l'export de lactate, un ciblage des 2 transporteurs MCT1/4 est nécessaire. La perte de capacité de prolifération ne semble pas forcément être due à une capacité accrue d'expulser les acides⁷⁹. Il se pourrait que les cellules souches, qui exprimeraient plus MCT4 (notamment dans le glioblastome⁷⁹) soient plus sensibles à la sous-expression de MCT4 qu'à des variations de flux de lactate. Cependant nos résultats montrant l'effet anti prolifératif corrélé avec le blocage de l'export d'acide lactique (EACR, Figure 36) par la combinaison de l'inhibition de MCT1/4 nous incite à proposer que l'impact négatif sur la glycolyse est responsable de l'effet anti-prolifératif.

Il restait toutefois une capacité proliférative résiduelle de la lignée Hs578t même après ciblage des 2 MCTs, faisant suggérer que les cellules s'adaptent en 'switchant' leur métabolisme

glycolytique vers la respiration. C'est ce qui a effectivement été observé avec une augmentation de la consommation d'oxygène (Figure 39). Nous avons donc postulé que ces cellules bloquées pour la glycolyse seraient devenues extrêmement sensibles aux inhibiteurs de respiration tels qu'oligomycine ou du complexe I mitochondrial : metformine/phenformine. Nous observons en effet que la phenformine (50 μ M) inhibe la respiration (OCR) et induit un effet anti-prolifératif maximal lorsque associé à l'inhibition des MCTs (Figure 39). A noter que la phenformine seule, uniquement en normoxie, avait un effet antiprolifératif à la fois sur la lignée Hs578t WT et la lignée MDAMB231 (Figure 39 et 40) montrant l'intérêt potentiel de cet inhibiteur. En hypoxie, en l'absence d'oxygène donc, la phenformine n'avait aucun effet puisque les cellules vont majoritairement utiliser la glycolyse anaérobie.

Une autre étude avait déjà montré l'effet d'inhibiteurs des MCTs sur des lignées de cancer du sein (alpha-cyano-4-hydroxycinnamate (CHC), Quercetin and Lonidamine ⁹⁷) mais les inhibiteurs utilisés étaient peu spécifiques des MCTs et pouvaient avoir des effets anti-prolifératifs autres que par l'inhibition de l'export de lactates. La meilleure stratégie semble donc être la triple inhibition de MCT1/MCT4/complexe I de la mitochondrie. Une telle approche qui vise la production d'ATP est-elle envisageable et raisonnable en clinique ? Les besoins énergétiques des cellules différenciées des tissus adultes chez l'homme au repos sont très faibles. A l'opposé les cancers à croissance rapide (glioblastomes, TNEG) utilisent massivement la glycolyse grâce à leurs équipements en transport GLUT1, MCT4 hautement exprimés. Il est donc raisonnable de proposer des fenêtres thérapeutiques 'flash' (3-4 jours) associant les bloqueurs de glycolyse (LDHA ou MCTs) associés à la phenformine pour éradiquer ces cancers par 'catastrophe métabolique' ou 'ATP crisis' ³. La combinaison différée à ces traitements d'un 'flash' de chimiothérapie ou de radiothérapie permettrait également d'avoir un effet additif étant donné que MCT4 est surexprimé en hypoxie et que les cellules hypoxiques sont chimio et radorésistantes. A noter qu'Astrazeneca a développé un inhibiteur de MCT4 qui sera prochainement testé dans notre laboratoire. Une collaboration avec l'équipe d'Elisabetta Marangoni (institut Curie) permettra également au cours du 1^{er} semestre 2014 de tester ces inhibiteurs dans des modèles murins de cancers du sein. Son équipe a en effet constitué une banque de souris porteuses de xénogreffes de tumeurs mammaires humaines qui ont été implantées directement de la pièce opératoire sans passer par la boîte de Petri, avec entretien de la xénogreffe depuis des années sans modification ni des altérations du nombre de copies de gènes (données de CGH-array), ni de l'expression

ARNm entre la tumeur mammaire originelle et entre les xénogreffes dans le temps ⁹⁸. Nous avons caractérisé 27 xénogreffes de cancers TNEG au niveau du marquage IHC MCT1, MCT4 et GLUT1 et identifié des tumeurs avec tous les profils possibles qui serviront pour les expériences de l'année 2014. Les résultats d'anatomopathologie des TNEG présentés ici seront publiés avec les futures études pré-clinique chez la souris utilisant phenformine seule et en association avec les inhibiteurs de MCTs.

6. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis pour la première fois l'analyse exhaustive des marqueurs métaboliques de la glycolyse dans les cancers du sein sans envahissement ganglionnaire (travail du Dr Trastour) et dans les cancers du sein TNEG. Elle a montré que les cancers du sein sont inégaux vis à vis des capacités glycolytiques avec des marqueurs bien plus présents dans les cancers TNEG, et à un moindre degré dans les tumeurs surexprimant Her-2. Il existait une corrélation entre les capacités de prolifération et l'expression de ces marqueurs. Dans les 2 cohortes l'expression strictement tumorale de MCT4 représentait un puissant facteur pronostique de SSRM et de SP démontrant l'importance de cette protéine dans l'agressivité tumorale, de par ses puissantes capacités d'expulsion de l'acide lactique, mais aussi peut-être de par son possible enrichissement en cellules souches tumorales. In vitro le ciblage des transporteurs d'acide lactique, en particulier de MCT4, avait un effet anti-prolifératif intéressant qui était toutefois maximal si la respiration mitochondriale était bloquée dans le même temps. Ces données sont à confirmer *in vivo* dans des modèles de TNEG humain xénogreffés chez la souris avant de passer chez l'homme pour notamment tester la toxicité et le potentiel thérapeutique de ces nouvelles stratégies.

7. Bibliographie

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
2. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581:3582-91.
3. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013;13:611-23.
4. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:168-81.
5. Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul* 2010;50:20-33.
6. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, et al. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem* 1998;46:497-504.
7. Scheurer SB, Rybak JN, Rosli C, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* 2004;4:1737-60.
8. Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008;283:27799-809.
9. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 2004;577:439-45.
10. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009;69:358-68.
11. Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* 2004;64:6160-5.
12. Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:767-77.
13. Stillebroer AB, Boerman OC, Desar IM, et al. Phase 1 radioimmunotherapy study with lutetium 177-labeled anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody girentuximab in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2013;64:478-85.
14. Tureci O, Sahin U, Vollmar E, et al. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7608-13.
15. Ilie MI, Hofman V, Ortholan C, et al. Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. *Int J Cancer* 2011;128:1614-23.
16. Bayat Mokhtari R, Kumar S, Islam SS, et al. Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines. *BMC Cancer* 2013;13:378.
17. Xiang Y, Ma B, Li T, Yu HM, Li XJ. Acetazolamide suppresses tumor metastasis and related protein expression in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:745-51.
18. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 2006;66:632-7.
19. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* 2012;64:1-9.
20. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 2012;44:127-39.

21. Miranda-Goncalves V, Honavar M, Pinheiro C, et al. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro Oncol* 2013;15:172-88.
22. Fiaschi T, Marini A, Giannoni E, et al. Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. *Cancer Res* 2012;72:5130-40.
23. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16663-8.
24. Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann KH, et al. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut* 2009;58:1391-8.
25. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010;14:771-94.
26. Semenza GL, Rue EA, Iyer NV, Pang MG, Kearns WG. Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region of conserved syntenic on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics* 1996;34:437-9.
27. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441:437-43.
28. Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* 2001;491:85-90.
29. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
30. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
31. Gong L, Zhang W, Zhou J, et al. Prognostic Value of HIFs Expression in Head and Neck Cancer: A Systematic Review. *PLoS One* 2013;8:e75094.
32. Dhakal HP, Nesland JM, Forsund M, Trope CG, Holm R. Primary Tumor Vascularity, HIF-1alpha and VEGF expression in vulvar squamous cell carcinomas: their relationships with clinicopathological characteristics and prognostic impact. *BMC Cancer* 2013;13:506.
33. Trastour C, Benizri E, Ettore F, et al. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer* 2007;120:1451-8.
34. Ji X, Wang H, Zhu J, et al. Correlation of Nrf2 and HIF-1alpha in glioblastoma and their relationships to clinicopathologic features and survival. *Neurol Res* 2013.
35. Muriel Lopez C, Esteban E, Berros JP, et al. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2012;10:262-70.
36. Kong D, Park EJ, Stephen AG, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 2005;65:9047-55.
37. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 2009;15:6479-83.
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
39. Zeller KI, Zhao X, Lee CW, et al. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17834-9.
40. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:51-6.
41. Shim H, Dolde C, Lewis BC, et al. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6658-63.
42. Li F, Wang Y, Zeller KI, et al. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:6225-34.
43. Fuchs BC, Bode BP. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol* 2005;15:254-66.

44. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 1998;273:23629-32.
45. Betsunoh H, Fukuda T, Anzai N, et al. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13:509.
46. Kaira K, Toyoda M, Shino M, et al. Clinicopathological significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in patients with adenoid cystic carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2013;19:649-56.
47. Kaira K, Sunose Y, Ohshima Y, et al. Clinical significance of L-type amino acid transporter 1 expression as a prognostic marker and potential of new targeting therapy in biliary tract cancer. *BMC Cancer* 2013;13:482.
48. Yanagisawa N, Ichinoe M, Mikami T, et al. High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2012;65:1019-23.
49. Kaira K, Takahashi T, Murakami H, et al. Relationship between LAT1 expression and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients with postoperative recurrence. *Anticancer Res* 2011;31:3775-82.
50. Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci* 2012;103:382-9.
51. Martens-de Kemp SR, Brink A, Stigter-van Walsum M, et al. CD98 marks a subpopulation of head and neck squamous cell carcinoma cells with stem cell properties. *Stem Cell Res* 2013;10:477-88.
52. Desantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013.
53. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295:2492-502.
54. Basu S, Chen W, Tchou J, et al. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters: a potentially useful method for disease characterization. *Cancer* 2008;112:995-1000.
55. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol* 2005;207:260-8.
56. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:273-80.
57. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:4660-71.
58. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
59. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008;123:236-40.
60. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68.
61. Goncalves A, Sabatier R, Charafe-Jauffret E, et al. [Triple-negative breast cancer: histoclinical and molecular features, therapeutic management and perspectives]. *Bull Cancer* 2013;100:453-64.
62. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-67.
63. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012;486:405-9.
64. Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012;486:395-9.

65. Haviland JS, Owen JR, Dewar JA, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2013;14:1086-94.
66. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736-47.
67. Gluck S, de Snoo F, Peeters J, Stork-Sloots L, Somlo G. Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139:759-67.
68. Martin M, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:149-57.
69. Cameron D, Brown J, Dent R, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:933-42.
70. Gerber B, Loibl S, Eidtmann H, et al. Neoadjuvant bevacizumab and anthracycline-taxane-based chemotherapy in 678 triple-negative primary breast cancers; results from the geparquinto study (GBG 44). *Ann Oncol* 2013.
71. Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet* 2011;377:914-23.
72. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666-76.
73. Keam B, Im SA, Koh Y, et al. Early metabolic response using FDG PET/CT and molecular phenotypes of breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* 2011;11:452.
74. Basu SK, Schwartz C, Fisher SG, et al. Unilateral and bilateral breast cancer in women surviving pediatric Hodgkin's disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:34-40.
75. Ortiz AP, Frias O, Perez J, et al. Breast cancer molecular subtypes and survival in a hospital-based sample in Puerto Rico. *Cancer Med* 2013;2:343-50.
76. Murray CM, Hutchinson R, Bantick JR, et al. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol* 2005;1:371-6.
77. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007;109:1721-8.
78. Aleskandarany MA, Green AR, Benhasouna AA, et al. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14:R3.
79. Lim KS, Lim KJ, Price AC, Orr BA, Eberhart CG, Bar EE. Inhibition of monocarboxylate transporter-4 depletes stem-like glioblastoma cells and inhibits HIF transcriptional response in a lactate-independent manner. *Oncogene* 2013.
80. Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2784-9.
81. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009;458:780-3.
82. Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* 2012;30:372-8.
83. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2011;11:671-7.
84. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298-306.

85. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013;31:860-7.
86. Vu-Nishino H, Tavassoli FA, Ahrens WA, Haffty BG. Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breast-conserving therapy (BCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:1040-7.
87. Merezinskaya N, Ogunwuyi SA, Mullick FG, Fishbein WN. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1483-93.
88. Pahlman C, Qi Z, Murray CM, et al. Immunosuppressive properties of a series of novel inhibitors of the monocarboxylate transporter MCT-1. *Transpl Int* 2013;26:22-9.
89. de Kruif EM, van Nes JG, van de Velde CJ, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:687-96.
90. Choi J, Kim DH, Jung WH, Koo JS. Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Res* 2013;15:R78.
91. Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, et al. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol* 2011;26:1279-86.
92. Pinheiro C, Albergaria A, Paredes J, et al. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* 2010;56:860-7.
93. Meijer TW, Schuurbiens OC, Kaanders JH, et al. Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer* 2012;76:316-23.
94. Fisel P, Kruck S, Winter S, et al. DNA methylation of the SLC16A3 promoter regulates expression of the human lactate transporter MCT4 in renal cancer with consequences for clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2013;19:5170-81.
95. Witkiewicz AK, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A, et al. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 2012;11:1108-17.
96. Neumeister VM, Sullivan CA, Lindner R, et al. Hypoxia-induced protein CAIX is associated with somatic loss of BRCA1 protein and pathway activity in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;136:67-75.
97. Morais-Santos F, Miranda-Goncalves V, Pinheiro S, et al. Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2013.
98. Reyat F, Guyader C, Decraene C, et al. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* 2012;14:R11.

8. Travaux annexes

8.1. Article 1: Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis

Le premier travail rapporte les résultats des expériences ayant évalué la combinaison du ciblage des anhydrases carboniques CAIX et CAXII et de la radiothérapie. En partant du principe que les tumeurs sont constituées d'une zone normoxique radiosensible et d'une zone hypoxique radiorésistante de par l'effet "oxygène" (cf article), il apparaît intéressant d'ajouter à la radiothérapie un inhibiteur permettant de cibler les zones hypoxiques. Puisque les cellules de ces zones surexpriment les anhydrases carboniques CAIX, et à un moindre degré CAXII, nous avons évalué la combinaison de la radiothérapie avec la sous-expression de CAIX et/ou de CAXII dans un modèle de carcinome colorectal (LS174) in vitro et in vivo (xénogreffes murines). Nous avons retrouvé un effet additif de cette stratégie à la fois in vitro et in vivo avec une capacité de prolifération réduite aussi bien pour les sphéroïdes que pour les tumeurs murines. Nous avons ensuite confirmé in vitro cette stratégie dans une lignée de fibroblaste immortalisé (PS120) et mis en évidence que l'acidose intracellulaire était un nouveau facteur déterminant de radiosensibilisation. Il apparaît que même les cellules normoxiques voyaient leur mort cellulaire augmenter en association avec une inhibition d'un de leur régulateur du pH intracellulaire (NHE1 ou CAIX). Le mécanisme sous-jacent pouvant être un shift des cellules en phase G2/M avec diminution de la phase S, phase qui sont respectivement les plus radiosensibles et les plus radiorésistantes. Chez l'homme, un essai de phase II sera prochainement débuté au Centre Antoine-Lacassagne et testera l'association de l'acétazolamide (pan inhibiteur des anhydrases carboniques) avec une radiochimiothérapie à base de sels de platine (docetaxel/paclitaxel, carboplatine/cisplatine) dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade III.



Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis

Jérôme Doyen^{1,2}, Scott K. Parks¹, Serge Marcié², Jacques Pouyssegur^{1,3} and Johanna Chiche^{1*}

¹ Institute for Research on Cancer and Aging of Nice, CNRS UMR 7284, University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France

² Department of Radiation Oncology, Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

³ Centre Scientifique de Monaco, Monaco

Edited by:

Lorenzo Galluzzi, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

Reviewed by:

Silvia Pastorekova, Slovak Academy of Sciences, Slovakia

Ian Kunkler, University of Edinburgh, UK

Brad Wouters, Ontario Cancer Institute, Canada

*Correspondence:

Johanna Chiche, INSERM U 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Team 3 "Metabolic control of cell deaths," 151 Route de Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex, France.
e-mail: chiche@unice.fr

The relationship between acidosis within the tumor microenvironment and radioresistance of hypoxic tumor cells remains unclear. Previously we reported that hypoxia-induced carbonic anhydrases (CA) IX and CAXII constitute a robust intracellular pH (pH_i)-regulating system that confers a survival advantage on hypoxic human colon carcinoma LS174Tr cells in acidic microenvironments. Here we investigate the role of acidosis, CAIX and CAXII knock-down in combination with ionizing radiation. Fibroblasts cells (–/+ CAIX) and LS174Tr cells (inducible knock-down for *ca9/ca12*) were analyzed for cell cycle phase distribution and survival after irradiation in extracellular pH_o manipulations and hypoxia (1% O₂) exposure. Radiotherapy was used to target *ca9/ca12*-silenced LS174Tr tumors grown in *nude* mice. We found that diminishing the pH_i-regulating capacity of fibroblasts through inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger 1 sensitize cells to radiation-induced cell death. Secondly, the pH_i-regulating function of CAIX plays a key protective role in irradiated fibroblasts in an acidic environment as accompanied by a reduced number of cells in the radiosensitive phases of the cell cycle. Thirdly, we demonstrate that irradiation of LS174Tr spheroids, silenced for either *ca9* or both *ca9/ca12*, showed a respective 50 and 75% increase in cell death as a result of a decrease in cell number in the radioresistant S phase and a disruption of CA-mediated pH_i regulation. Finally, LS174Tr tumor progression was strongly decreased when *ca9/ca12* silencing was combined with irradiation *in vivo*. These findings highlight the combinatory use of radiotherapy with targeting of the pH_i-regulating CAs as an anti-cancer strategy.

Keywords: carbonic anhydrases, hypoxia, intracellular pH, ionizing radiation, tumor growth

INTRODUCTION

Ionizing radiation is used therapeutically to induce cancer cell death, decrease distant metastasis rates, and to increase overall patient survival (Darby et al., 2011). However, radiotherapy does not efficiently target all cells of the tumor mass. Tumor cell re-population and activation of DNA repair mechanisms (ATM, γH2AX, and p53) are key components of tumor cell radioresistance (Huen and Chen, 2008). Cells in the G2/M and G1 phases of the cell cycle have been shown to be the most radiosensitive, while cells in the S phase are radioresistant (Hwang et al., 2000; Pawlik and Keyomarsi, 2004). The latter is attributed to DNA double strand breaks (DSBs) repair systems such as homologous recombination that occur in the S phase (Kastan and Bartek, 2004; Jackson and Bartek, 2009). In the 1950s, several groups established the connection between hypoxia and radioresistance in mammalian tumors (Deschner and Gray, 1959; Dewey, 1960) and oxygen levels remain the major cell radiosensitizer known to date. In well-oxygenated conditions, the free radicals generated by ionizing radiation insult react with O₂ to form peroxy radicals that damage DNA much more efficiently than reduced free radicals (Brown, 2007). Consequently, the poorly oxygenated (hypoxic)

cells of tumors are more radioresistant (Gray, 1953). These studies led to the general hypothesis that oxygen acts at a physicochemical level to improve radiation induced damage as a consequence of the high affinity between the oxygen molecule and the unpaired electron on the free radical produced by radiation.

In addition to low oxygen, increased acidification is also a hallmark of hypoxic tumors and it has been suggested to play an indirect role in the poor radioresponse of hypoxic tumors (Vaupe, 2004). In contrast, another report indicates that extracellular acidosis may enhance radiosensitivity in combination with lactate accumulation for certain cell lines (Grotius et al., 2009). However, lactate accumulation alone (in the absence of pH disruption) has also been suggested to reduce radiosensitivity of tumor cells (Quennet et al., 2006). Furthermore, the effect of intracellular pH (pH_i) and extracellular pH (pH_o) regulation on the efficacy of irradiation remains to be clarified.

Despite the fact that all mammalian cells are capable of protecting their cytosol from acidification through expression of membrane located transporters and exchangers including the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE-1; Pouyssegur et al., 1985) and the monocarboxylate transporter 1 (MCT1; Halestrap and Price,

1999), hypoxic tumor cells have developed additional mechanisms to regulate their pH_i (Chiche et al., 2010b). In solid tumors, membrane-bound carbonic anhydrases (CA) IX and XII are controlled by oxygen levels *via* the hypoxia-inducible factor (HIF-1; Wykoff et al., 2000) and catalyze at the cell surface the reversible hydration of carbon dioxide (CO_2) into a proton (H^+) and bicarbonate (HCO_3^-). Once generated, HCO_3^- is proposed to be rapidly taken up into the cell through the $Na^+-HCO_3^-$ cotransporters (NBC; Romero et al., 2004; Parks et al., 2011) to sustain a slightly alkaline pH_i compatible with cell survival (Morgan et al., 2007; Swietach et al., 2009; Chiche et al., 2010a). Many reports correlate CAIX expression with poor patient survival in a variety of cancers (see review Supuran, 2008; Chiche et al., 2010a). The extracellular location of the CAIX active site together with its overexpression in hypoxic cancer cells compared to minimal expression in healthy cells, except in the gastro-intestinal tract and the stomach (Pastoreková et al., 1997) makes hypoxia-induced CAIX an accessible target for new anti-cancer therapy (Supuran, 2008; Morris et al., 2011). CAIX function has been clearly established to contribute to extracellular acidification (Svastová et al., 2004). In addition, studies in our laboratory have characterized CAIX and CAXII as robust pH_i -regulating enzymes and have provided evidence that both CAIX and CAXII hold potential as new anti-cancer targets (Chiche et al., 2010a).

We analyzed the downstream effects of CAIX and CAXII activity on radiation-induced cell death to determine whether a combined therapy of irradiation and down-regulation of CAIX and CAXII would sensitize hypoxic cells to ionizing radiation. An alteration in pH_i regulation (either by inhibition of NHE-1 or expression of CAIX) revealed a decreased percentage in cells found in the radioresistant S phase and an *in vitro* radiosensitization that correlated with an increase in cell death. Gene silencing of *ca9* and *ca9/ca12* revealed *in vitro* and *in vivo* radiosensitization as a consequence of a reduction of cells in the S phase and a decrease in the pH_i -regulating capacity of the cell.

MATERIALS AND METHODS

CELL CULTURE AND HYPOXIC EXPOSURE

Chinese hamster lung CCL39 fibroblasts (ATCC), CCL39-derived PS120 cells lacking NHE-1, and CAIX and CAXII, were cultured as described. Colon adenocarcinoma LS174Tr cells expressing the tetracycline (Tet) repressor were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and blasticidin (10 μ g/ml, Invitrogen). Incubation in hypoxia at 1% O_2 was carried out at 37°C in 95% humidity and 5% CO_2 /94% N_2 in a sealed anaerobic workstation (Ruskinn).

CELL IRRADIATION

Irradiation of normoxic cells was performed in 25 cm^2 ventilated flasks (Nunc), while irradiation of hypoxic cells was performed in 25 cm^2 non-ventilated flasks to maintain 1% O_2 during treatment after removal from the hypoxic workstation. Cells were irradiated 100 cm from the source with a bolus of 1.1 cm (under dishes). High energy photons were used (6 MV), delivered by a linear accelerator (PRIMUS®, Siemens) with a 40 cm \times 40 cm posterior field. The dose rate of the PRIMUS was 300 monitor units/min and 2 Gy corresponded to 93 monitor units (18.6 s). Spheroids

were irradiated with the same schedule but with an anterior field and a bolus placed at the top of the dishes.

PLASMIDS

Full-length human *ca9* cDNA was obtained and inserted into pTREX-A (pcDNA4/TO/myc-His A; Invitrogen; *pca9*) as described (Chiche et al., 2010a). The short-hairpin (sh) RNA-*ca9* (*shca9*) was obtained with oligonucleotides: forward 5'-AGTTAAGCCTAAATCAGAA-3' and reverse 5'TTCTGATTGAGGCTTAAC-3' and inserted into either pTER vector (also named *shca9*). Lentivirus particles for two independent sequences (#1 and #2) of pLKO.1-Puro shRNA targeting *ca12* (*ca12*⁻) and non-target shRNA (*ctl*; Sigma, TRCN0000116249, TRCN0000116251, and SHC002V) were used to constitutively silence *ca12*.

STABLE TRANSGENIC CELLS

PS120 cells were transfected with *pca9* as described (Chiche et al., 2010a). Tet (10 μ g/ml)-inducible LS174Tr cells silenced for *ca9* (LS-*shca9/ctl*) combined with a constitutive silencing of *ca12* (LS-*shca9/ca12*⁻) were obtained as described (Chiche et al., 2010a).

IMMUNOBLOTTING

Cells were lysed in 1.5 \times SDS sample buffer. Proteins (40 μ g) were separated on 7.5% SDS polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were blotted with the M75 antibody to CAIX (Bayer), a polyclonal antibody to recombinant CAXII (Sigma), p21 (Santa Cruz), β 1 integrin (Cell Signalling), and Hsp90 (Abcam). Immunoreactive bands were detected with a horseradish peroxidase-anti-mouse or anti-rabbit antibody (Promega) by ECL (Amersham Biosciences).

CELL CYCLE ANALYSIS

Cells (3×10^5) exposed to normoxia or hypoxia were washed in PBS and fixed in ice-cold 70% ethanol for a minimum of 30 min. Cells were centrifuged, washed in 38 mM sodium citrate (pH 7.4), and stained for 20 min at 37°C with 50 μ g/ml propidium iodide (Sigma) and 5 μ g/ml RNase A (Sigma) in sodium citrate solution. Cell cycle analysis was done by flow cytometry using a FACScan calibur (Becton Dickinson). The proportion of G1, G2/M peaks, and the S phase plateau were calculated with WinMD2 software.

MEASURE OF RADIATION-INDUCED CELL DEATH

Fibroblasts (1×10^4) were seeded onto 60 mm dishes. Once attached the medium was replaced by either HCO_3^- -free or 10 mM HCO_3^- -containing DMEM buffered at an extracellular pH (also named outside pH, pH_o) of 7.0 (30 mM MES) or at pH_o 7.5 (30 mM HEPES), supplemented with 10% dialyzed serum, hypoxanthine 0.1 mM, and uridine triphosphate 0.1 mM for growth in the absence of CO_2/HCO_3^- and transferred to a CO_2 -free atmosphere for 24 h in the presence or absence of inhibitors [NHE-1 inhibitor HOE#694 (Hoechst) 100 μ M]. Dishes were then irradiated (0, 2, 4, 6, 8, and 10 Gy). After irradiation, dishes were returned to 5% CO_2 in regular $NaHCO_3$ -containing medium for 5 days. Cells were then trypsinized and the percentage of cell death was determined with trypan blue.

CLONING EFFICIENCY

LS174Tr cells were plated in clonogenic conditions (1000 cells per plate, triplicate) in 25 cm² ventilated flasks during 24 h, then exposed to hypoxia (1% O₂) for 48 h, and subsequently closed with non-ventilated flask caps before irradiation (0, 1, 2, 4, 6, and 8 Gy). Cells were then returned to normoxic conditions to allow cell recovery and determination of colony number following irradiation. PS120 cells were plated onto 60 mm dishes in clonogenic conditions (1000 cells per dish, duplicate). Once attached, cells were exposed to 30 mM HEPES, 100 μ M hypoxanthine, 100 μ M uridine, and 10% dialyzed FCS medium adjusted to two different extracellular pH (either pH_o 7.0 or 7.5) in a CO₂/HCO₃⁻ free environment and subsequently irradiated (0, 1, 2, 4, 6, and 8 Gy) in these environments. Following irradiation, the medium were replaced by a regular medium. Six days (for PS120 cells) or 10 days (for LS174Tr cells) following irradiation, cells were fixed, stained with Giemsa, and counted using ImageJ® software. Of note for both LS174 and PS120 cells, irradiation was not performed but after two or three cell divisions. This raises the possibility of microcolony formation and overestimation of the number of colonies, however, we used caution to exclude microcolonies from our final analysis. Furthermore, our calculations involve a ratio between experimental clones and control. Therefore, the absolute number of clones is normalized because every condition grows with the same amplitude of error.

CELL PROLIFERATION IN THREE-DIMENSIONS AND IRRADIATION OF SPHEROIDS

To grow spheroids, 2 × 10³ cells were seeded in drops in 20 μ l of HCO₃⁻-free DMEM buffered with 30 mM HEPES pH 7.7 containing 10% FCS. After 8 days, spheroids were irradiated (0, 2, 4, 6, and 8 Gy) as described above. Intact spheroids were then transferred to polyhema-coated 96-well plates for continued growth in the same respective media for 4 days (12 days total growth time including irradiation). Spheroids were dissociated in Accutase (Life Technologies) and living and dead cells were immediately counted using trypan blue exclusion.

NUDE MICE XENOGRAFTS AND IRRADIATION OF MOUSE TUMORS

Cells (1 × 10⁶) were subcutaneously injected into the flanks of 4-week-old male athymic *nude* mice (Harlan) according to CNRS institutional guidelines and tumor growth was measured as reported previously (Chiche et al., 2010a). A total of 750 μ g/ml doxycycline (DOX; Sigma) was added in the drinking water before the injection of tumor cells following the previously established protocol in our laboratory allowing us to obtain 90% of *ca9* silencing *in vivo* (see Chiche et al., 2010a) for immunohistochemical analysis of inducible *ca9* silencing in this model). Tumors of 4–5 mm were irradiated (8 Gy) with contact X-rays (Gérard et al., 2011) using a RT 50 Phillips unit delivering a 50-kV maximal energy X-ray beam. The source–surface distance was 40 mm and the dose rate was 20 Gy/min. The X-ray tube was handheld and the precision was controlled through direct vision by the radiation oncologist using a 20-mm diameter applicator. The dose was prescribed at the exit surface of the

applicator. One single fraction of 8 Gy was delivered into the visible lesion.

STATISTICAL ANALYSIS

The Student's *t*-test was used wherein *P*-values of <0.05 were considered significant.

RESULTS

INHIBITION OF THE MAJOR pH_i-REGULATING SYSTEM NHE-1 SENSITIZES CELLS TO RADIATION-INDUCED CELL DEATH

The contribution of intracellular acidosis to cell radiosensitivity was studied on fibroblasts growing in pH_o 7.5 or a more acidic pH_o 7.0 medium, in the presence or in the absence of NHE-1 inhibitor. We choose to work at pH_o of 7.0 as it is low enough to reduce the pH_i compared to the pH_i obtained at pH_o of 7.5 but is not low enough to prevent an observation of radiosensitization in acidic conditions due to a reduction in cell viability caused by acidosis alone. The impact of inhibiting NHE-1 on pH_i regulation in these cells has been well established with NHE-1 inhibition causing a significant reduction in pH_i in a pH_o of 7.0 (Pouysségur et al., 1984). Prior to irradiation, we determined the effect of NHE-1 inhibition on cell cycle phase distribution. Selective inhibition of NHE-1 using HOE#694 (100 μ M; see Masereel et al., 2003 for a review of NHE inhibitors and HOE#694 effectiveness) at the more acidic pH_o 7.0 condition reduced the percentage of CCL39 cells in the most radioresistant S phase (34% decrease of cells in the radioresistant S phase in the presence of HOE#694 compared to non-treated cells) while it had no effect in a more neutral pH_o 7.5 medium (Figure 1A). Consistent with this finding, irradiation of NHE-1-inhibited fibroblasts in a pH_o 7.0 medium led to an increase in cell death (57% for 10 Gy) compared to either untreated cells (35% for 10 Gy; Figure 1B) or cells exposed to a pH_o 7.5 medium treated or not with HOE#694 (32% for 10 Gy; Figure 1C).

EXPRESSION OF THE HYPOXIA-INDUCED pH_i-REGULATING CARBONIC ANHYDRASE IX PROTECTS CELLS AGAINST IRRADIATION

We have previously demonstrated that expression of catalytically active CAIX in NHE-1-deficient CCL39 fibroblasts (PS120 cells) maintains a higher pH_i compared to control PS120 cells lacking CAIX, when cells were exposed to a nominally bicarbonate free acidic medium (Chiche et al., 2010a). Here we showed that in the condition where CAIX is required for pH_i regulation (pH_o 7.0 compared to pH_o 7.5 medium), expression of CAIX in PS120 cells (PS120-*pca9*) maintains the distribution of the cell cycle phases, while in the absence of CAIX, PS120-*pev* cells demonstrate a 35% reduction in the most radioresistant S phase (Figure 2A). Consequently, control PS120-*pev* cells growing at pH_o 7.0 were shown to be more radiosensitive than PS120-*pca9* cells, with 70% cell death following irradiation of 10 Gy for PS120-*pev* cells compared to 37% for PS120-*pca9* cells (Figure 2B). Of note, PS120-*pca9* cells irradiated with 10 Gy at pH_o 7.0 exhibited similar cell death rates to that at pH_o 7.5 while PS120-*pev* cells had much higher cell death at low pH_o (Figures 2B,C). Thus, active CAIX protects cells against ionizing irradiation at low pH. To definitively validate that the pH_i-regulating functions of CAIX are indeed involved in cellular radioprotection, PS120-*pev* and PS120-*pca9* cells were exposed to a pH_o 7.0 medium containing 10 mM HCO₃⁻. This

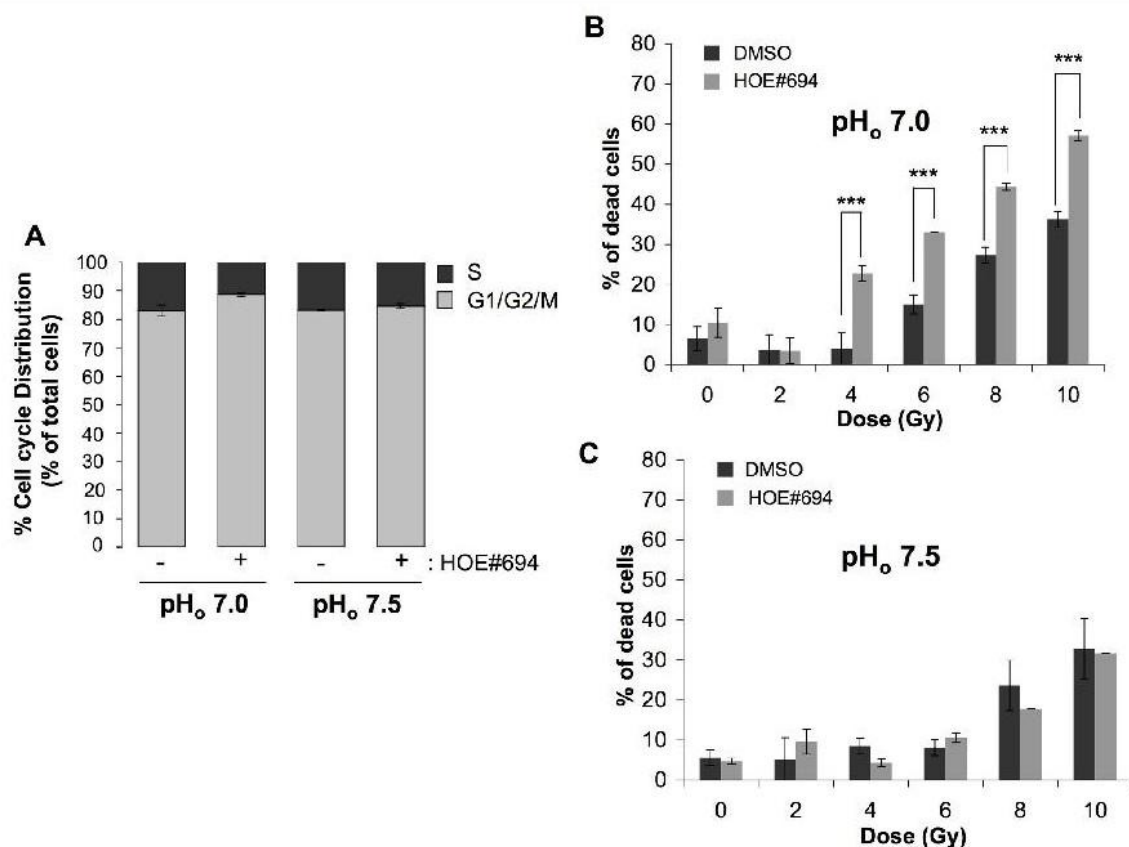


FIGURE 1 | NHE-1 protects cells against irradiation-induced cell death in an acidic environment. (A) Cell cycle distribution of CCL39 cells treated (+) or not (–) with 100 μ M of the NHE-1 inhibitor (HOE#694) in normoxia in a $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -free environment at pH_o 7.5 or 7.0 for 24 h. **(B,C)** CCL39 cells (1×10^4) were plated in 60 mm dishes. Once attached cells were incubated in

a HCO_3^- -free medium adjusted to pH_o 7.5 or 7.0, and treated in the presence (+) or absence (–) of 100 μ M of NHE-1 inhibitor (HOE#694) for 24 h in a CO_2 -free atmosphere. Dishes were then irradiated (0, 2, 4, 6, 8, and 10 Gy) and returned to a 5% CO_2 incubator with fresh HCO_3^- -containing medium for 4 days. Cell death was determined by the trypan blue exclusion assay.

HCO_3^- addition has been shown previously to maintain pH_i in acidic pH_o environments (Chiche et al., 2010a). Irradiation of PS120-*pev* cells in the presence of HCO_3^- reduced the percentage of cell death to that obtained for PS120-*pca9* cells in a pH_o 7.0 medium (Figure 2D). Cloning efficiency experiments also confirm the capacity of irradiated cells to survive and recover following irradiation. From 4 to 8 Gy single doses of ionizing radiation of PS120-*pev* cells exposed to a pH_o 7.0 medium drastically reduced the cloning efficiency, compared to that observed in a pH_o 7.5 medium (Figure 2E, left panel). In contrast, PS120-*pca9* cells exposed to a pH_o 7.0 medium were capable to recover after irradiation, to the same extent that we observed in a pH_o 7.5 (Figure 2E, right panel). Taken together these results suggest that the pH_i-regulating properties of NHE-1 and CAIX protect cells against irradiation.

DUAL SILENCING OF THE HYPOXIA-INDUCED pH_i-REGULATING-SYSTEM *ca9/ca12* STRONGLY COMPROMISES *IN VITRO* AND *IN VIVO* TUMOR GROWTH WHEN COMBINED WITH IONIZING RADIATION

LS174Tr cells cultured in hypoxia before exposure to an increasing dose of ionizing radiation demonstrated a higher cloning

efficiency than normoxic cells along with equal distribution of cell cycle phases before irradiation (data not shown). This established the classical radioresistance of LS174Tr cells as observed in other hypoxic cells and validated this model for our study. In a regular HCO_3^- -containing medium a higher number of cells in the radiosensitive G1/G2/M phases was observed when *ca9* or both *ca9* and *ca12* were silenced (Figure 3A). Protein expression levels of CAIX and CAXII in the Tet-inducible silencing of *ca9* in control LS174Tr cells (LS-*shca9/ctl*) or *ca12* silenced cells (LS-*shca9/ca12*[−]) were confirmed for efficient knock-down (Figure 3A, inset). In the same conditions, *ca9* or both *ca9/ca12* silencing was accompanied by an increase in p21, E-cadherin, and $\beta 1$ integrin expression, which were associated with a reduced cell proliferation (Figure 3B). To mimic both the tumor hypoxic and proton gradient observed *in vivo*, we grew LS174 cells in three dimensions. Spheroids were grown in nominally bicarbonate free media to enhance the pH gradients that develop during spheroid growth. Irradiation of *ca9*-silenced spheroids (LS-*shca9/ctl* + Tet, 8 Gy) revealed a cumulative decrease in the proliferation index (Figure 3C) and a twofold increase in cell death from 27.5% (0 Gy) to 51.7% (8 Gy) when compared to non-irradiated *ca9*-silenced spheroids (Figure 3D). While *ca12* silencing alone did not alter

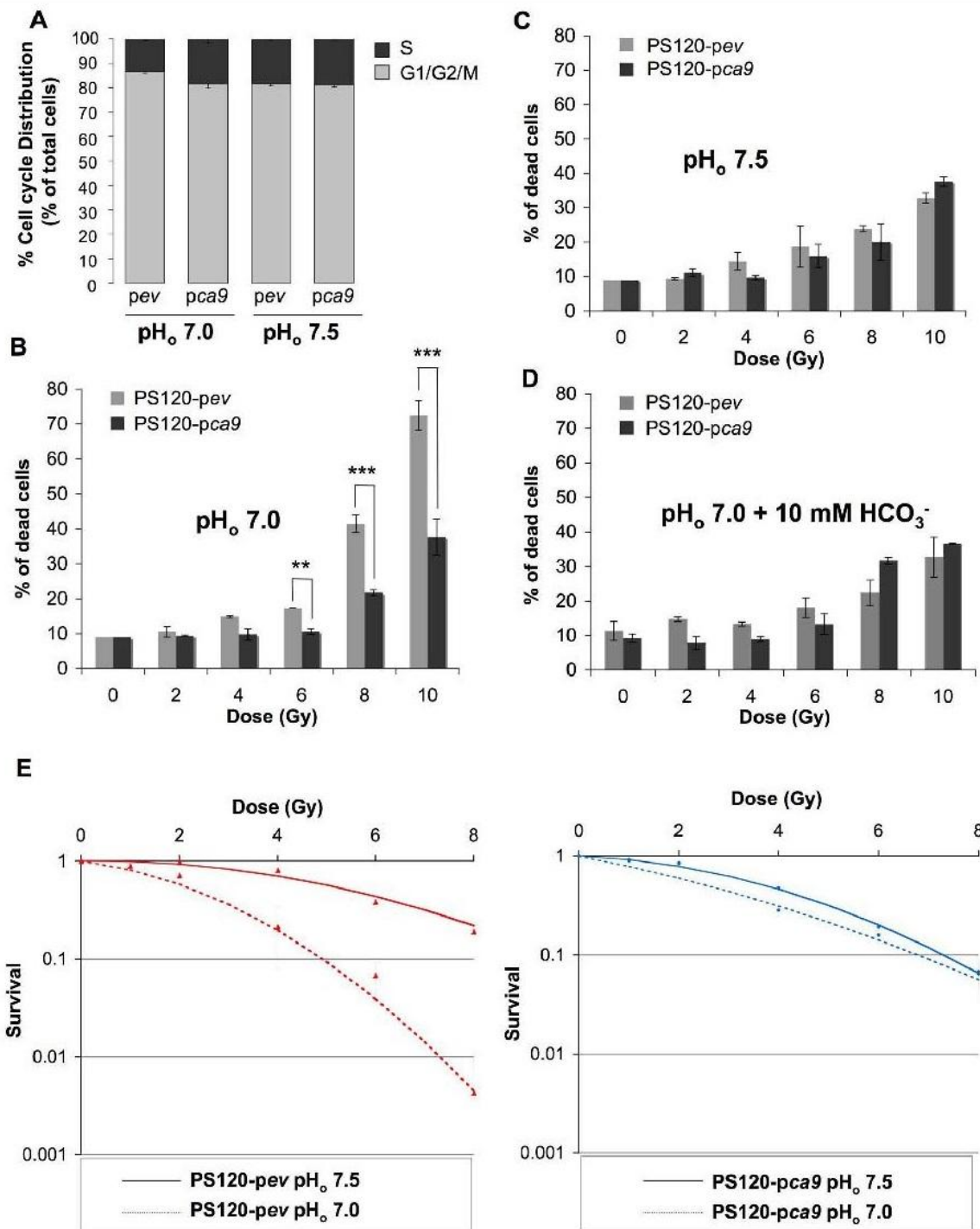


FIGURE 2 | CAIX protects cells against irradiation-induced cell death in an acidic environment. (A) Cell cycle distribution of NHE-1-disrupted fibroblasts PS120 cells expressing (*pca9*) or not (*pev*) CAIX, in normoxia in a HCO₃⁻/CO₂-free environment at pH_o 7.0 or 7.5 for 24 h. (B–D) PS120-pev and PS120-*pca9* cells (1 × 10⁴) were plated in 60 mm dishes. Once attached cells were incubated in 30 mM HEPES-buffered HCO₃⁻-free medium adjusted to pH_o 7.0 in the absence (B) or in the presence of 10 mM HCO₃⁻ (D) or to pH_o 7.5 (C) for 24 h in a CO₂-free atmosphere. Dishes were then irradiated (0, 2, 4, 6, 8, and 10 Gy) and returned to a

CO₂-containing incubator with fresh regular HCO₃⁻-containing (44 mM) medium for 4 days. Cell death was determined by the trypan blue exclusion assay. Data represent the average of three independent experiments. (E) The clonogenic capacity of PS120-pev and PS120-*pca9* cells exposed to a medium adjusted to pH_o 7.0 or 7.5 was measured 10 days after irradiation (0, 1, 2, 4, 6, and 8 Gy). Dishes were stained with Giemsa (Fluka). The colonies were counted with ImageJ software according to the following parameters: particles size = 0.15–5 mm² and circularity = 0.1–1.

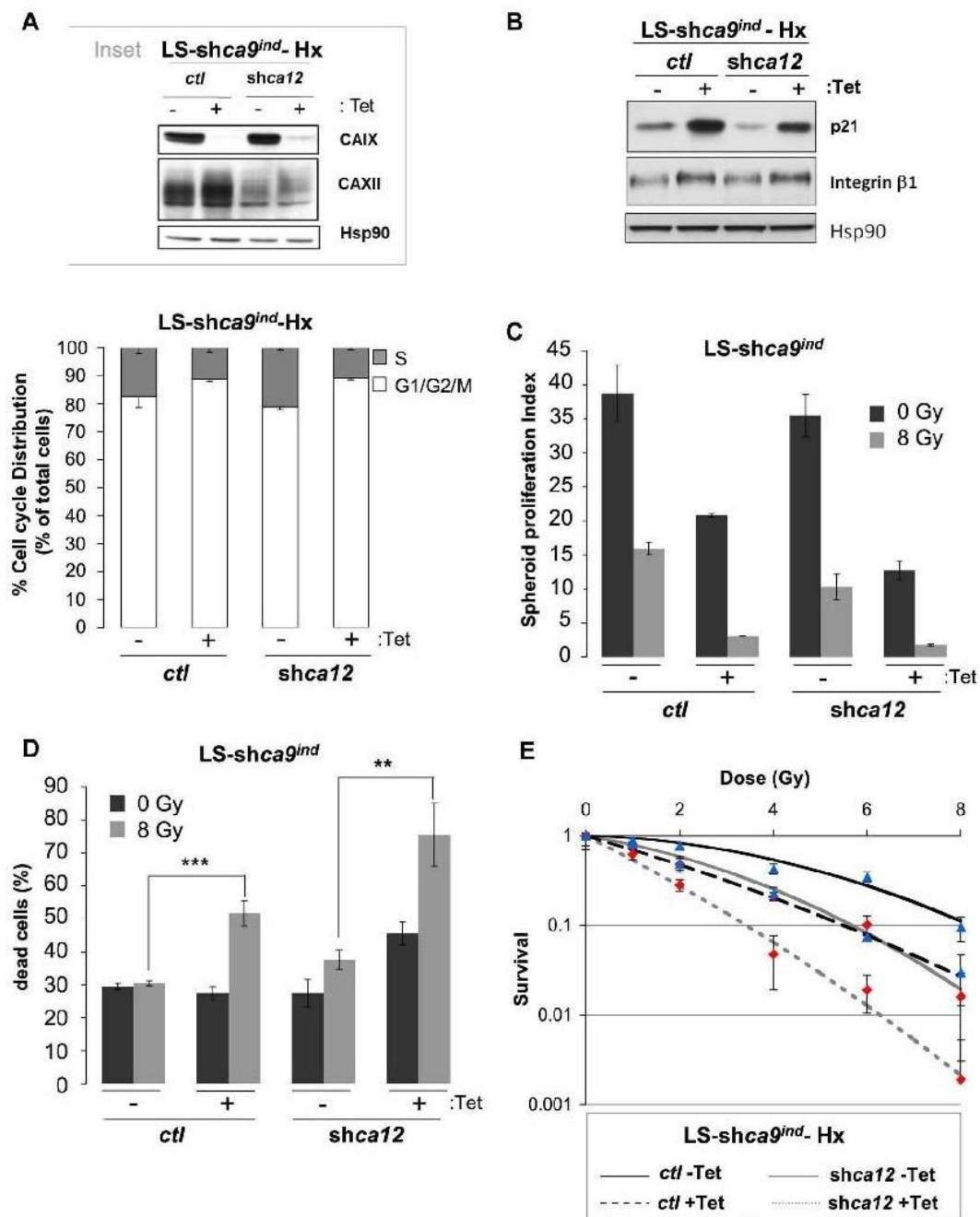


FIGURE 3 | Silencing of the hypoxia-induced pH_i-regulating enzymes *ca9* and *ca12* induced *in vitro* cell death of LS174Tr cells when combined with ionizing radiation. (A) Inset: Expression of CAIX and CAXII in colon carcinoma Tetracycline (Tet)-inducible LS-shca9/ctl -Tet cells either silenced for *ca9* (LS-shca9/ctl +Tet) or for *ca12* (LS-shca9/ca12⁻ -Tet) or both *ca9* and *ca12* (LS-shca9/ca12⁻ +Tet) in hypoxia 1% O₂ (Hx) for 48 h. Hsp90 was used as a loading control. The cell cycle phase distribution was determined by FACS analysis of LS-shca9/ctl -/+Tet and LS-shca9/ca12⁻ -/+Tet cells exposed hypoxia of 1% O₂ (Hx) for 24 h in a HCO₃⁻-containing medium. (B) Immunoblotting of p21, β1 integrin, and Hsp90 (loading control) in LS-shca9/ctl and LS-shca9/ca12⁻ cells pre-incubated for 4 days in the presence (+Tet) or absence (-Tet) of Tet to silence *ca9*, before exposure to hypoxia of 1% O₂ (Hx) for 48 h (H). (C,D). Tet-inducible LS174Tr cells silenced for *ca9* or *ca12* or both *ca9* and

ca12 were cultured as spheroids in a CO₂ atmosphere and HEPES-buffered HCO₃⁻-free medium (pH_o 7.7 in the absence (-Tet) or presence (+Tet) of Tet for 8 days before they were irradiated (8 Gy) or not (0 Gy). After irradiation, spheroids were transferred to polyhema-coated 96-well plates containing fresh medium for 5 days. Spheroids were then subjected to Accutase dissociation and individualized live cells (C) and dead cells (D) were counted using trypan blue. The spheroid proliferation index was calculated as the ratio of the number of living cells counted at day 13 to the number of cells at day 0. Data represent the average of three independent experiments. (E) The clonogenic capacity of LS174Tr-shca9/ctl -/+Tet and LS174Tr-shca9/ca12⁻ -/+Tet cells exposed to hypoxia (1% O₂) for 48 h in a regular medium, was measured 10 days after irradiation (0, 1, 2, 4, 6, and 8 Gy). Dishes were stained with Giemsa (Fluka). The colonies were counted with Image J software.

the proliferation rate of non-irradiated spheroids, irradiation of *ca12*-silenced cells (LS-sh*ca9/ca12*⁻ -Tet 8 Gy) reduced the proliferation index (**Figure 3C**) and increased cell death from 27.5% (0 Gy) to 37.6% (8 Gy; **Figure 3D**). Irradiation of double silenced cells (LS-sh*ca9/ca12*⁻ +Tet 8 Gy) strongly compromised proliferation and viability (75.5% cell death; **Figures 3C,D**). Clonogenic test confirmed that double silenced cells (LS-sh*ca9/ca12*⁻ +Tet) exposed to hypoxia were less capable to recover from irradiation compared to control cells (LS-sh*ca9/ctl* -Tet) or single *ca9* or *ca12*-silenced cells (LS-sh*ca9/ctl* +Tet and LS-sh*ca9/ca12*⁻ -Tet; **Figure 3E**).

Using contact radiotherapy (Gérard et al., 2011), we specifically targeted the established tumor mass grown on the back of *nude* mice. Irradiation of control tumors (LS-sh*ca9/ctl* -DOX + IR) stopped tumor progression for 5 days after irradiation before proliferating again at a high rate, which was similar to that of non-irradiated control tumors (LS-sh*ca9/ctl* -DOX; **Figure 4A**). Tumor progression was delayed with *ca9*-silencing as observed previously while irradiation of *ca9*-silenced tumors (LS-sh*ca9/ctl* +DOX +IR) showed more pronounced arrest in tumor progression (25 days after irradiation to reach 600 mm³), which may reflect cell death within the tumor (**Figure 4A**). Irradiation of *ca12*-silenced tumors (LS-sh*ca9/ca12*⁻ -DOX +IR) reduced the growth rate compared to non-irradiated tumors (LS-sh*ca9/ca12*⁻ -DOX) to the same extent observed for irradiation of control tumors suggesting that *ca12* alone is not able to confer tumor radioresistance (**Figure 4B**). However, irradiation of double silenced tumors (LS-sh*ca9/ca12*⁻ +DOX +IR) showed a substantial reduction in the progression of the tumor (33 days after irradiation to reach 600 mm³). No interaction between DOX and irradiation was observed as shown with control LS-sh*ev/ctl* -/+DOX tumors (**Figure 4C**). Calculations of the tumor growth delay for time required to reach 300 and 600 cm³, respectively were 17.6/19.7 days (LS174shCA9 -Dox, -IR), 25.7 days/29.1 days (LS174shCA9 -Dox, +IR), 25.7 days/29 days (LS174shCA9 +Dox, -IR) and 36 days/46.3 days (LS174shCA9 +Dox, +IR). Growth delay times for CA9/CA12 double-silencing were 33.9 days/39.9 days (LS174shCA9/CA12 +Dox, -IR) and 36.1 days/45.9 days (LS174shCA9/CA12 +Dox, +IR). We further calculated the specific tumor growth delay (STGD) with the following formula: STGD = (DT experimental - DT control)/DT control (DT, doubling time). Irradiation alone and CA9 silencing alone resulted in similar STGD values of 0.61 and 0.57, respectively. Combined irradiation and silencing of CA9 increased the STGD to 3.9 compared to control. Meanwhile silencing of CA12 resulted in a STGD value of 1.85 while double CA9 and CA12 silencing with irradiation had a similar STGD value to CA9 silencing of 3.67.

These results demonstrate that silencing of *ca9* and double-silencing of *ca9/ca12* combined with ionizing radiation substantially decreases tumor growth in both *in vitro* and *in vivo* model systems.

DISCUSSION

Acidosis within the tumor microenvironment arises from the hypoxia-induced metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, along with the capacity of hypoxic tumor cells to

regulate their pH_i through efficient export of CO₂ and lactic acid. Consequently, targeting tumor pH_i-regulating systems in hypoxia holds potential as a key strategy to reduce tumor growth (Pouysségur et al., 2006). Here we have explored a combination of this pH disrupting strategy with radiotherapy as it was suggested that acidosis plays a role in tumor radioresistance (Vaupe, 2004). However, previously there was no clear demonstration whether the extracellular and/or the intracellular acidosis were responsible for the poor radioresponse of tumor cells. Dubois et al. (2011) have demonstrated that a combination of CAs inhibition with irradiation in colon HT29 tumor-bearing mice improved the anti-tumor effect compared to a single radiation dose. However, CA inhibition did not result in increased radiosensitivity *in vitro* and the contribution of the pH-regulating functions of CAIX in the tumor radio-response remained to be clarified. Herein, we demonstrate the importance of pH_i regulation in radioresistance by observing an increase in radiation-induced cell death of fibroblasts inhibited for NHE-1 or lacking both NHE-1 and CAIX when they are grown in an acidic and HCO₃⁻-free medium. In contrast, ectopic expression of CAIX was able to improve cell survival following irradiation. The mechanism of CAIX-induced radioresistance was demonstrated with NHE-1-deficient CCL39 fibroblasts (PS120 cells) in a nominally CO₂/HCO₃⁻ free acidic environment by: (i) a decrease in the pH_i-regulating capacity of cells lacking CAIX (see Chiche et al., 2009) and (ii) a correlation with the positioning of these cells in the most radiosensitive G1/G2/M phases, prior to irradiation. This cell cycle data is consistent with the reduction in S phase entry as previously demonstrated for PS120 cells compared to the parental cell line (Pouysségur et al., 1985). Expression of CAIX prevents the reduction of cells in S phase as it allows cells to maintain a higher pH_i in acidic medium (Chiche et al., 2010a). With addition of HCO₃⁻/CO₂ in low pH medium (pH_o 7.0) we observed no difference in cell death between irradiated-PS120-*pev* and irradiated-PS120-*pca9* cells due to the buffering ability of HCO₃⁻/CO₂ to restore alkaline pH_i values as previously demonstrated (Chiche et al., 2010a). We conclude that the CAIX-induced protection against irradiation at pH_o 7.0 could be explained by the capacity of CAIX to sustain an intracellular alkaline shift.

Under three-dimensional growth conditions that result in hypoxia (Chiche et al., 2010a; Pelletier et al., 2012) and acidosis (Swietach et al., 2010), LS174Tr spheroids silenced for *ca9/ca12* showed a decrease in proliferation and a cumulative increase in cell death (75%) after a single radiation dose. Double silenced cells were indeed most sensitive to irradiation, since: (i) combined silencing reduced the capacity of LS174Tr cells to regulate their pH_i in acidic medium while single silencing of *ca9* was not sufficient to do so (Chiche et al., 2010a), (ii) silencing of *ca9/ca12* increased p21 expression indicating a cell cycle arrest in G1 along with increased levels of β1 integrin, two key proteins involved in cell contact and adhesion which may influence proliferation (Svastová et al., 2003) and (iii) *ca9* silencing lead to a reduction in proliferation and a decrease in cell number in the radioresistant S phase. A single radiation dose on xenograft tumors dramatically reduced the growth rate of *ca9*- and *ca9/ca12*-silenced tumors. Twenty-five days after irradiation, *ca9*-silenced tumors recovered a growth rate that was comparable to control tumors, while *ca9/ca12*-silenced

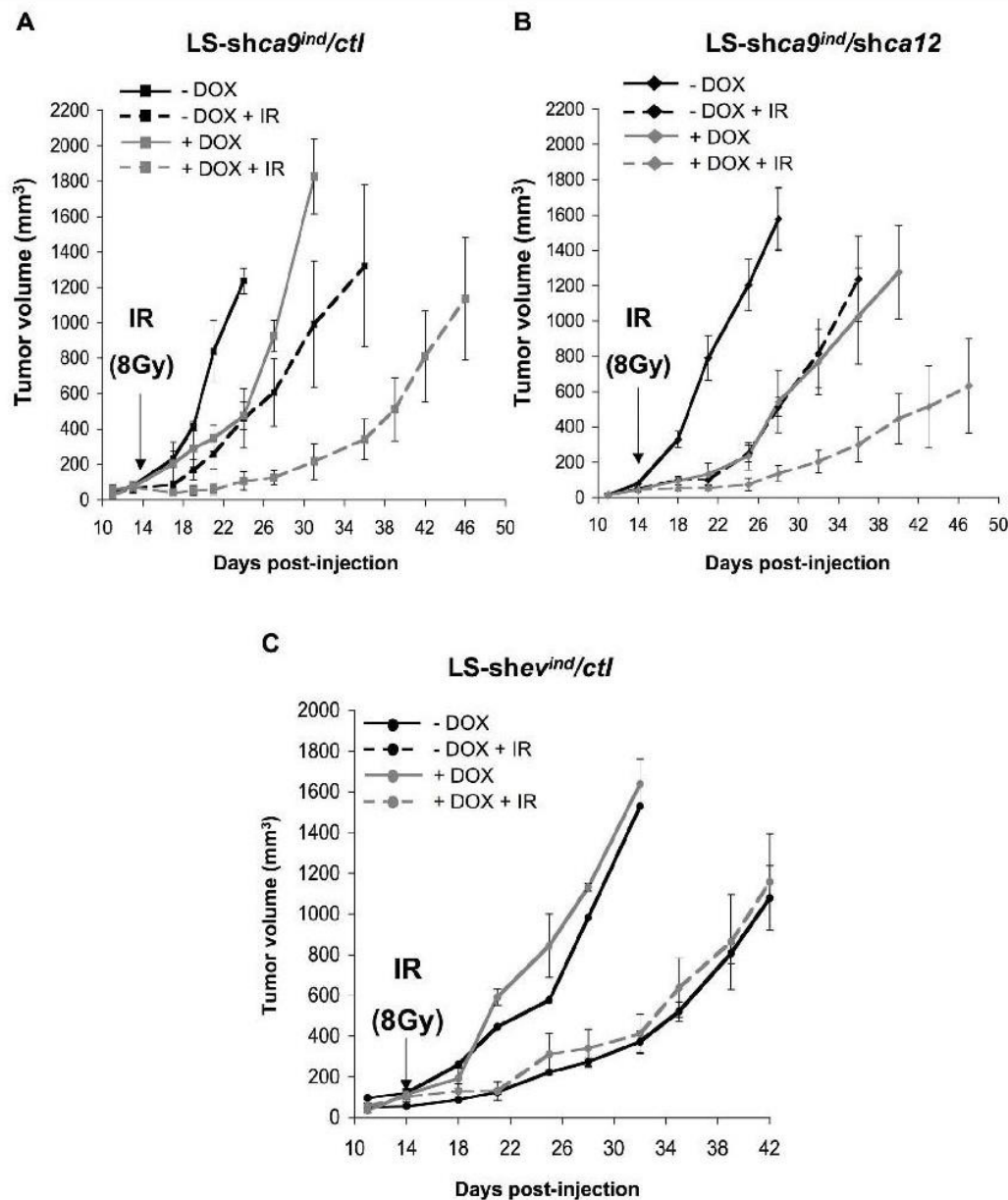


FIGURE 4 | Combined silencing of *ca9* and *ca12* compromises *in vivo* LS174Tr cell proliferation when combined with ionizing radiation. (A,B). Anti-tumor activity of silencing *ca9* or *ca12* individually or combined is increased in conjunction with ionizing radiation in LS174Tr xenograft tumors. At 4 days before injection of LS-shca9/ctl (A) or LS-shca9/ca12⁻ cells (B), cells were incubated with or without Tet (+/-Tet) to silence *ca9*. *In vivo* xenograft assays were performed by s.c injection of viable and individual tumor cells (1×10^6) into the flanks of athymic nude mice. To maintain

ca9 knock-down mice received DOX in the drinking water 4 days before cell injection. Fifteen days after cell injection, when the tumor size reached 4–5 mm, a single dose (8 Gy) of irradiation (IR) was delivered to the tumors only with "contact X-rays." Xenograft growth was determined by measuring the tumor volume. (C) Xenograft tumor growth of control tumors LS-shca9/ctl irradiated (IR) or not, in the presence (+DOX) or in the absence (-DOX) of doxycycline in the drinking water. Five mice were used per condition.

and irradiated tumors never recovered the growth rate of control cells. In addition, the loss of radioresistant hypoxic cells due to CA9/CA12 silencing could contribute to the reduction of tumor growth in combination with their radio-sensitivity due to decreased pH_i regulation.

Hypoxia-specific cytotoxins such as tirapazamine form toxic radical species that act to kill hypoxic cells and are thus proposed to be used in combination with irradiation to create a synergistic effect (Brown, 1993). Unfortunately this treatment-strategy failed to be efficient in patients (Rischin et al., 2010). Intense research

is ongoing in the development of small molecule inhibitors to specifically target membrane-bound CA(s) over cytosolic CAs to appraise the potential of targeting CAIX and CAXII to decrease tumor progression (Morris et al., 2011). The synthesis of new CA(s) inhibitors (Supuran, 2008; Morris et al., 2011) has also revived interest in acetazolamide (ACTZ), which has been used in the clinic for over 40 years as a CA inhibitor (Kaur et al., 2002). Recently, ACTZ was linked to a C-terminal albumin-binding peptide (Albu-ACTZ) with the aim of not only reducing blood clearance but also preventing internalization of the molecule to target more specifically membrane-bound CAIX and CAXII. This compound demonstrated its *in vivo* efficacy by retarding tumor growth of renal SK-RC-52 xenografts. However, it had no significant impact on highly proliferative LS174Tr tumors (Ahlskog et al., 2009).

In the present study, we took advantage of the expression of the hypoxia-induced pH_i-regulating systems CAIX and CAXII to

target radioresistant hypoxic cells. This study reinforces the notion that CAIX and CAXII represent potential targets for anti-cancer treatment. The present study also supports the use of radiotherapy in combination with CAs inhibition as a new anti-cancer strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

The laboratory is funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée), the EU-FP7-“METOXIA,” the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Institut National du Cancer, the Agence Nationale pour la Recherche, the Centre Antoine Lacassagne, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the University of Nice. Scott K. Parks was funded by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). Johanna Chiche was funded by the “METOXIA” grant and the ARC.

REFERENCES

- Ahlskog, J. K., Dumelin, C. E., Trüssel, S., Märklind, J., and Neri, D. (2009). In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 4851–4856.
- Brown, J. M. (1993). SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br. J. Cancer* 67, 1163–1170.
- Brown, J. M. (2007). Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol.* 435, 297–321.
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. (2010a). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 771–794.
- Chiche, J., Ilc, K., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. (2010b). Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv. Enzyme Regul.* 50, 20–33.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., Trotter, E., Dayan, E., Mazure, N. M., et al. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 69, 358–368.
- Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., et al. (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 378, 1707–1716.
- Deschner, E. E., and Gray, L. H. (1959). Influence of oxygen tension on x-ray-induced chromosomal damage in Ehrlich ascites tumor cells irradiated in vitro and in vivo. *Radiat. Res.* 11, 115–146.
- Dewey, D. L. (1960). Effect of oxygen and nitric oxide on the radiosensitivity of human cells in tissue culture. *Nature* 186, 780–782.
- Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N. G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., et al. (2011). Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother. Oncol.* 99, 424–431.
- Gérard, J. P., Myint, A. S., Croce, O., Lindegaard, J., Jensen, A., Myerson, R., et al. (2011). Renaissance of contact x-ray therapy for treating rectal cancer. *Expert Rev. Med. Dev.* 8, 483–492.
- Gray, L. H. (1953). The initiation and development of cellular damage by ionizing radiations; the thirty-second Silvanus Thompson Memorial Lecture. *Br. J. Radiol.* 26, 609–618.
- Grotius, J., Dittfeld, C., Huether, M., Mueller-Klieser, W., Baumann, M., and Kunz-Schughart, L. A. (2009). Impact of exogenous lactate on survival and radioresponse of carcinoma cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 989–1001.
- Halestrap, A. P., and Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 343, 281–299.
- Huen, M. S., and Chen, J. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* 18, 8–16.
- Hwang, H. S., Davis, T. W., Houghton, J. A., and Kinsella, T. J. (2000). Radiosensitivity of thymidylate synthase-deficient human tumor cells is affected by progression through the G1 restriction point into S-phase: implications for fluoropyrimidine radiosensitization. *Cancer Res.* 60, 92–100.
- Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Kaur, I. P., Smitha, R., Aggarwal, D., and Kapil, M. (2002). Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int. J. Pharm.* 248, 1–14.
- Masereel, B., Pochet, L., and Laeckmann, D. (2003). An overview of inhibitors of Na⁺/H⁺ exchanger. *Eur. J. Med. Chem.* 38, 547–554.
- Morgan, P. E., Pastoreková, S., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L., and Casey, J. R. (2007). Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C738–C748.
- Morris, J. C., Chiche, J., Grellier, C., Lopez, M., Bornaghi, L. E., Maresca, A., et al. (2011). Targeting hypoxic tumor cell viability with carbohydrate-based carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *J. Med. Chem.* 54, 6905–6918.
- Parks, S. K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2011). pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J. Cell. Physiol.* 226, 299–308.
- Pastoreková, S., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Opavsky, R., Zelnik, V., Saarnio, J., et al. (1997). Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 112, 398–408.
- Pawlik, T. M., and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 928–942.
- Pelletier, J., Dayan, E., Durivault, J., Ilc, K., Pécou, E., Pouyssegur, J., et al. (2012). The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis. *Oncogene* 31, 2989–3001.
- Pouyssegur, J., Dayan, E., and Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.
- Pouyssegur, J., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S. (1985). Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett.* 190, 115–119.
- Pouyssegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S. (1984). A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4833–4837.
- Quennet, V., Yaromina, A., Zips, D., Rosner, A., Walenta, S., Baumann, M., et al. (2006). Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother. Oncol.* 81, 130–135.
- Rischin, D., Peters, L. J., O'Sullivan, B., Giralt, J., Fisher, R., Yuen, K., et al. (2010). Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, Head-START): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 28, 2989–2995.

- Romero, M. F., Fulton, C. M., and Boron, W. F. (2004). The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Pflügers Arch.* 447, 495–509.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 168–181.
- Svastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., et al. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 577, 439–445.
- Svastová, E., Zilka, N., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Ciampor, F., Pastorek, J., et al. (2003). Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp. Cell Res.* 290, 332–345.
- Swietach, P., Hulíková, A., Vaughan-Jones, R. D., and Harris, A. L. (2010). New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene* 29, 6509–6521.
- Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C. T., Harris, A. L., and Vaughan-Jones, R. D. (2009). The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *J. Biol. Chem.* 284, 20299–20310.
- Vaupel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 14, 198–206.
- Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075–7083.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 01 September 2012; paper pending published: 20 September 2012; accepted: 07 December 2012; published online: 07 January 2013.

Citation: Doyen J, Parks SK, Marcié S, Pouysségur J and Chiche J (2013) Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. *Front. Oncol.* 2:199. doi: 10.3389/fonc.2012.00199

This article was submitted to *Frontiers in Molecular and Cellular Oncology*, a specialty of *Frontiers in Oncology*. Copyright © 2013 Doyen, Parks, Marcié, Pouysségur and Chiche. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

8.2. Article 2: miR-210 promotes a pseudohypoxic phenotype and increases tumor radioresistance in human lung cancer cell line A549

L'étude des microARN en cancérologie connaît un essor croissant avec la mise en évidence de corrélations pronostiques selon l'expression des microARNs et leur rôle pro-oncogène dans de nombreux cancers comme le cancer du poumon (Croce CM et al, causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer, Nature Reviews Genetic, 2009). Il existe des microARNs dont l'expression est régulée par l'hypoxie, appelés hypoxamirs comme le microARN miR-210 (Chan YC et al, miR-210, the master hypoxamir, Microcirculation, 2012) qui est considéré comme un des hypoxamirs majeurs. Notre groupe a montré précédemment que ce microARN était impliqué dans l'agressivité des carcinomes bronchiques chez l'homme (Puissegur MP et al, miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity, Cell Death Differentiation, 2011). Nous avons analysé l'impact de miR-210 in vitro vis à vis de la radiosensibilité des cellules de cancer du poumon A549. L'expression stable de miR-210 dans cette lignée a permis l'obtention d'une lignée ayant inhibé sa respiration mitochondriale, même en normoxie, mimant ainsi la surexpression de miR-210 en hypoxie. La radiosensibilité des cellules transfectées était en normoxie drastiquement réduite, avec une radiorésistance encore plus importante que celle observée en hypoxie et montrant ainsi le rôle majeur de miR-210 dans la radiorésistance de la lignée de cancer du poumon A549. Le marquage 53BP1 et γ H2AX était nettement moins marqué après irradiation de la lignée surexprimant miR-210 montrant ainsi la diminution des cassures double brins dans cette condition. Finalement il semblait que cette radiorésistance n'était pas liée à une modification de p53 ou des cycles cellulaires, mais par contre la sous-expression de HIF-1 α a permis de réverser la radiorésistance montrant qu'elle est liée à ce gène. L'implication de miR-210 dans la radiosensibilité des carcinomes bronchiques pourrait être analysée en clinique afin de déterminer les patients qui devraient bénéficier d'une escalade de dose de radiothérapie en cas de surexpression de ce micro-RNA.



MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines

S Grosso^{1,2,7}, J Doyen^{2,3,7}, SK Parks^{2,3}, T Bertero^{1,2}, A Paye⁴, B Cardinaud⁵, P Gounon^{2,6}, S Lacas-Gervais^{2,6}, A Noël⁴, J Pouyssegur^{2,3}, P Barbry^{1,2}, NM Mazure^{4,2,3} and B Mari^{4,1,2}

The resistance of hypoxic cells to radiotherapy and chemotherapy is a major problem in the treatment of cancer. Recently, an additional mode of hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent transcriptional regulation, involving modulation of a specific set of micro RNAs (miRNAs), including miR-210, has emerged. We have recently shown that HIF-1 induction of miR-210 also stabilizes HIF-1 through a positive regulatory loop. Therefore, we hypothesized that by stabilizing HIF-1 in normoxia, miR-210 may protect cancer cells from radiation. We developed a non-small cell lung carcinoma (NSCLC)-derived cell line (A549) stably expressing miR-210 (pmiR-210) or a control miRNA (pmiR-Ctl). The miR-210-expressing cells showed a significant stabilization of HIF-1 associated with mitochondrial defects and a glycolytic phenotype. Cells were subjected to radiation levels ranging from 0 to 10 Gy in normoxia and hypoxia. Cells expressing miR-210 in normoxia had the same level of radioresistance as control cells in hypoxia. Under hypoxia, pmiR-210 cells showed a low mortality rate owing to a decrease in apoptosis, with an ability to grow even at 10 Gy. This miR-210 phenotype was reproduced in another NSCLC cell line (H1975) and in HeLa cells. We have established that radioresistance was independent of p53 and cell cycle status. In addition, we have shown that genomic double-strand breaks (DSBs) foci disappear faster in pmiR-210 than in pmiR-Ctl cells, suggesting that miR-210 expression promotes a more efficient DSB repair. Finally, HIF-1 invalidation in pmiR-210 cells removed the radioresistant phenotype, showing that this mechanism is dependent on HIF-1. In conclusion, miR-210 appears to be a component of the radioresistance of hypoxic cancer cells. Given the high stability of most miRNAs, this advantage could be used by tumor cells in conditions where reoxygenation has occurred and suggests that strategies targeting miR-210 could enhance tumor radiosensitization.

Cell Death and Disease (2013) 4, e544; doi:10.1038/cddis.2013.71; published online 14 March 2013

Subject Category: Cancer Metabolism

It has been well established that hypoxic cells are more resistant to radiation therapy than are normoxic cells, as first demonstrated in 1953 by Gray *et al.*¹ Part of this resistance, called the 'oxygen effect', can be explained by a reduction in production capacity and reaction of free radicals of water radiolysis.² However, the master transcriptional activator of the hypoxic response, the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1),³ has also been widely linked to the radiation resistance of hypoxic cells.⁴ HIF-1 affects numerous processes, such as proliferation, migration or cellular metabolism, to activate survival pathways in response to radiation, and has been shown to be highly associated with poor prognosis and resistance to anticancer radiotherapy in many cancers.^{5–8}

In addition, targeting HIF-1 in tumor and stromal cells using different strategies can resensitize tumors to radiotherapy.^{9–11}

MicroRNAs (miRNAs)¹² are new factors implicated in the regulation of gene expression, and over the past decade they have been found to have key roles in cancers,^{13–16} including lung cancer.¹⁷ These molecules typically inhibit translation and/or reduce the stability of mRNAs of genes involved in tumorigenic processes, such as inflammation, cell cycle regulation, stress response, differentiation, apoptosis and invasion. Of note, recent studies have suggested a link between expression of some miRNAs and radiotherapy, particularly in lung cancer.^{18–21} Alterations in miRNAs expression can be caused by various mechanisms, including

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UMR 7275, Sophia Antipolis, France; ²University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France; ³Institute for Research on Cancer and Ageing (IRCAN), Institut National de la Santé et de la recherche Médicale INSERM U1081, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS UMR 7284, Nice, France; ⁴Laboratory of Tumor and Development Biology, Groupe Interdisciplinaire de Génomique Appliquée-Recherche (GIGA-Cancer), University of Liège, Liège, Belgium; ⁵Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, INSERM U1035, Université Victor Segalen, Bordeaux, France and ⁶Centre Commun de Microscopie Appliquée, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

*Corresponding author: NM Mazure, Institute for Research on Cancer and Ageing (IRCAN), Institut National de la Santé et de la recherche Médicale INSERM U1081, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS UMR 7284, Centre A. Lacassagne, 33 Avenue de Valombrose, Nice 06189, France. Tel: +33 492 031 230; Fax: +33 492 031 235; E-mail: mazure@unice.fr

or B Mari, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UMR 7275, 660, route des lucioles, Sophia Antipolis F-06560, France. Tel: +33 493 957 793; Fax: +33 493 957 794; E-mail: mari@unice.fr

⁷These authors contributed equally to this paper.

Keywords: apoptosis; hypoxia; microRNA; non-small cell lung cancer; radiotherapy

Abbreviations: CAIX, carbonic anhydrase IX; DSB, double-strand break; ETC, electron transport chain; HKII, hexokinase II; HIF-1, hypoxia-inducible factor 1; HRE, hypoxia responsive element; miRNA, microRNAs; NDUFA4, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex, 4; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; SDHD, succinate dehydrogenase complex, subunit D; UTR, untranslated region

Received 26.9.12; revised 22.1.13; accepted 23.1.13; Edited by D Aberdam

deletions, amplifications or mutations, epigenetic silencing, or dysregulation of transcription factors.¹⁶ Notably, it has been demonstrated that a specific set of miRNAs are upregulated by hypoxia.²² Among these hypoxia-regulated miRNAs, the HIF-1-responsive miR-210 appears as a unique evolutionarily conserved and ubiquitously expressed 'hypoxamir'.^{22,23} MiR-210 involvement in a wide-range of processes, including cell proliferation, migration, apoptosis, differentiation, DNA repair and cell metabolism,^{22,23} and more recently in the regulation of antitumor immune responses,²⁴ underline the role of this miRNA as a central master regulator of the hypoxic response. Among this wide range of cellular effects, miR-210 has been shown to repress mitochondrial metabolism by targeting a number of proteins that are crucial for normal tricarboxylic acid cycle and electron transport chain (ETC) activity. These include an iron-sulfur cluster assembly homolog 1/2 (ISCU1/2),^{25–27} cytochrome c oxidase assembly protein (COX10),²⁷ NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex 4 (NDUFA4), a subunit of ETC complex I, and succinate dehydrogenase complex, subunit D (SDHD), a subunit of the ETC complex II.²⁸ Recently, we demonstrated that miR-210 was overexpressed in the most aggressive stages in human non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) and correlated with a hypoxic signature.²⁸ We demonstrated that transient overexpression of miR-210 induced mitochondrial dysfunction and silenced the expression of SDHD, resulting in increased stabilization of HIF-1 α , even in normoxia. We, thus, hypothesized that overexpression of miR-210 could stabilize HIF-1 and induce a hypoxic response to affect the sensitivity of cancer cells to radiotherapy in normoxia. To answer these questions, we developed NSCLC-derived cell lines stably expressing miR-210 or a miR control (miR-Ctl), and compared their resistance to high doses of radiation (0–10 Gy).

Results

Generation and characterization of an A549-derived cell line stably expressing miR-210. Using lentiviral vectors, we first established A549 cells that stably overexpressed hsa-miR-210 or a control ce-miR-67, named pmiR-210 and pmiR-Ctl, respectively. A stable and moderate overexpression of miR-210 was observed in pmiR-210 cells in comparison with miR-Ctl cells (Figure 1a). Luciferase activity of a miR-210 sensor construct²⁹ was decreased in miR-210 cells compared with miR-Ctl cells, confirming that miR-210 activity was elevated in the pmiR-210 cells (Figure 1b). We then performed a transcriptomic analysis using human whole-genome expression microarrays. The comparison between miR-210 and miR-Ctl cells showed a modulation of 150 annotated transcripts, corresponding to 66 up- and 84 downregulated genes in the pmiR-210 cell line (Figure 1c). Several miR-210 predicted targets were found in the set of downregulated transcripts (Figure 1c). We next analyzed this set using our web tool 'MiRonTop'³⁰ to better characterize this effect. The results indicated an overrepresentation of miR-210-predicted targets in the set of downregulated transcripts (enrichment factor = 6.55; $P < 0.0001$), according to the 'TargetScan' algorithm with 16 predicted targets (Figure 1d and Table 1). Gene ontology analysis of these 16 genes showed an association with the 'ETC', confirming

the downregulation of two ETC subunits, SDHD and NDUFA4, which we had previously identified.²⁸ Moreover, validated miR-210 targets *ISCU1/2*²⁵ and *GPD1L*,^{31,32} two genes associated with the ability of miR-210 to downregulate mitochondrial respiration or promote glycolysis, were confirmed. We, therefore, established a stable population expressing hypoxic physiopathological levels of miR-210, which are able to constitutively repress genes associated with mitochondria metabolism.

MiR-210 alters mitochondrial function in A549 cells. We next analyzed the expression level of a selection of validated targets of miR-210 by qRT-PCR. A reduction of mRNA levels was observed for five targets of miR-210 in pmiR-210 cells, including *COL4A2*, *ISCU1/2*, *SDHD*, *DIMTL* and *GPD1L* (Figure 2a). A 50% decrease in the protein expression of ISCU1/2 confirmed the effective reduction in mRNA levels (Figure 2b). Transfection of NDUFA4 and SDHD 3'-untranslated region (UTR) pSiCheck-2 constructs showed a reproducible reduction of luciferase activity in pmiR-210 cells compared with pmiR-Ctl cells, confirming that both genes are direct miR-210 targets (Figure 2c). A significant reduction of SDH complex II activity was also noticed in pmiR-210 cells (Figure 2d). Finally, electron microscopy performed on pmiR-210 cells revealed enlarged mitochondria with rearranged cristae in comparison with the normal mitochondria morphology in pmiR-Ctl cells (Figures 2e and f). Overall, these results confirmed the strong link between miR-210 and mitochondrial functions.

Stable expression of miR-210 stabilizes HIF and promotes a more glycolytic phenotype. We investigated whether miR-210 was able to promote the stabilization of HIF-1 in pmiR-210 cells. We first monitored the expression of a sensitive target of HIF-1, carbonic anhydrase IX (CAIX, Figure 3a). Immunofluorescence confirmed that indeed HIF-1 was stabilized in pmiR-210 cells in normoxia in close relationship with the expression of CAIX (Figure 3b). No differences were observed between the proliferation rates of pmiR-Ctl and pmiR-210 cells (Figure 3c), strongly suggesting that the stabilization of HIF-1 was mainly due to miR-210-mediated metabolic gene targeting and not *via* an indirect mechanism mediated by an increased cell proliferation.³³

To compare the metabolic profiles of pmiR-Ctl and pmiR-210 cells, we used the SeaHorse XF bioenergetic system to quantify the mitochondrial respiration in which OXPHOS is measured by oxygen consumption rate (OCR) and glycolysis is measured by the generation of lactate as monitored by the consequent extracellular acidification rate (ECAR). Cells were deprived of glucose for 1 h, after which the effects of successive addition of glucose, oligomycin, FCCP and rotenone were measured for OXPHOS and glycolysis rates in real time. The maximum capacity of pmiR-Ctl cell respiration measured from the baseline in the presence of oligomycin and then FCCP was much larger than that obtained in the pmiR-210 cells, suggesting pmiR-210 cells have a lower respiratory capacity (Figure 3d, left panel). Moreover, the addition of oligomycin, which blocks mitochondrial ATP production, showed that pmiR-210 cells have an increased glycolytic rate compared with pmiR-Ctl (Figure 3d,

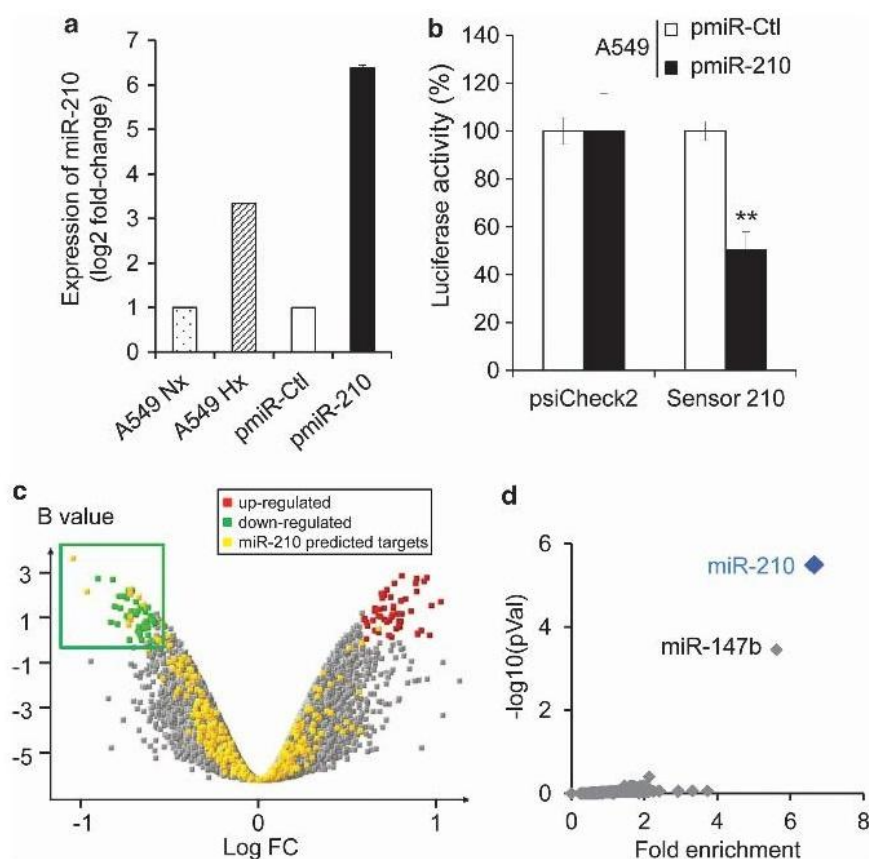


Figure 1 Identification of a miR-210 transcriptional signature in pmiR-210 A549 cells. (a) MiR-210 expression was analyzed by qRT-PCR on A549 cells cultivated in normoxia or hypoxia (1% O₂) and on A549-derived pmiR-Ctrl and pmiR-210 cells. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in duplicate. (b) Activity of miR-210 was assayed in pmiR-Ctrl and pmiR-210 cell lines with a 2 \times perfect sensor construct, and were normalized using psiCheck2. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in triplicate. ** $P < 0.05$. (c) Volcano plot showing the distribution of differentially expressed genes between pmiR-210 versus pmiR-Ctrl A549 cells. The green window focuses on significantly downregulated transcripts, containing a high proportion of miR-210-predicted targets (yellow dots). (d) Overrepresentation of miR-210-predicted targets in the pmiR-210 cell line according to TargetScan algorithm. Representation of miRNA predicted targets in the set of downregulated genes was compared with the set of all expressed genes. For each miRNA, a fold enrichment value (horizontal axis) and an associated P -value (vertical axis) were calculated. The best enrichment score and P -value are obtained for miR-210. A significant score is also obtained for miR-147b, confirming the close functional proximity of miR-210 and miR-147b¹¹

Table 1 List of the top miR-210 predicted targets significantly downregulated in the pmiR-210 A549 cell line

Symbol	Gene ID	AVEEXPR	LOGFC	Description
CORO1C	23603	11.68	-0.44	Coronin, actin binding protein, 1C
DIMT1L	27292	12.13	-0.89	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like
ELFN2	114794	9.27	-0.61	Extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 2
ENOX2	10495	9.65	-0.54	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2
FGFRL1	53834	8.56	-0.75	Fibroblast growth factor receptor-like 1
GPD1L	23171	9.58	-0.55	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
INF2	64423	10.78	-0.62	Inverted formin, FH2 and WH2 domain containing
ISCU1/2	23479	13.06	-0.58	Iron-sulfur cluster scaffold homolog
MITF	4286	9.84	-0.52	Microphthalmia-associated transcription factor
NDUFA4	4697	14.87	-0.58	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex, 4, 9 kDa
SDF2	6388	10.63	-0.61	Stromal cell-derived factor 2
SDHD	6392	11.06	-0.46	Succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein
ST6GAL2	84620	10.20	-0.57	ST6 β -galactosamide α -2,6-sialyltransferase 2
TMEM20	159371	7.98	-0.49	Transmembrane protein 20
TNPO1	3842	9.69	-0.41	Transportin 1
VAMP7	6845	11.21	-0.78	Vesicle-associated membrane protein 7

Sixteen of the miR-210 predicted transcripts selected using the bioinformatics tool miRnTop (<http://www.microarray.fr:8080/miRnTop/index>) are listed. The Target Prediction Tool used was TargetScan. Cutoff values for selection are equal to 7 for logarithm (base 2) of the average intensity (AveExpr), to 0.4 for the logarithm (base 2) of the ratio (pmiR-210/pmiR-Ctrl) (logFC) and 0 for the B -value. Gene ID: corresponds to NCBI Gene ID (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

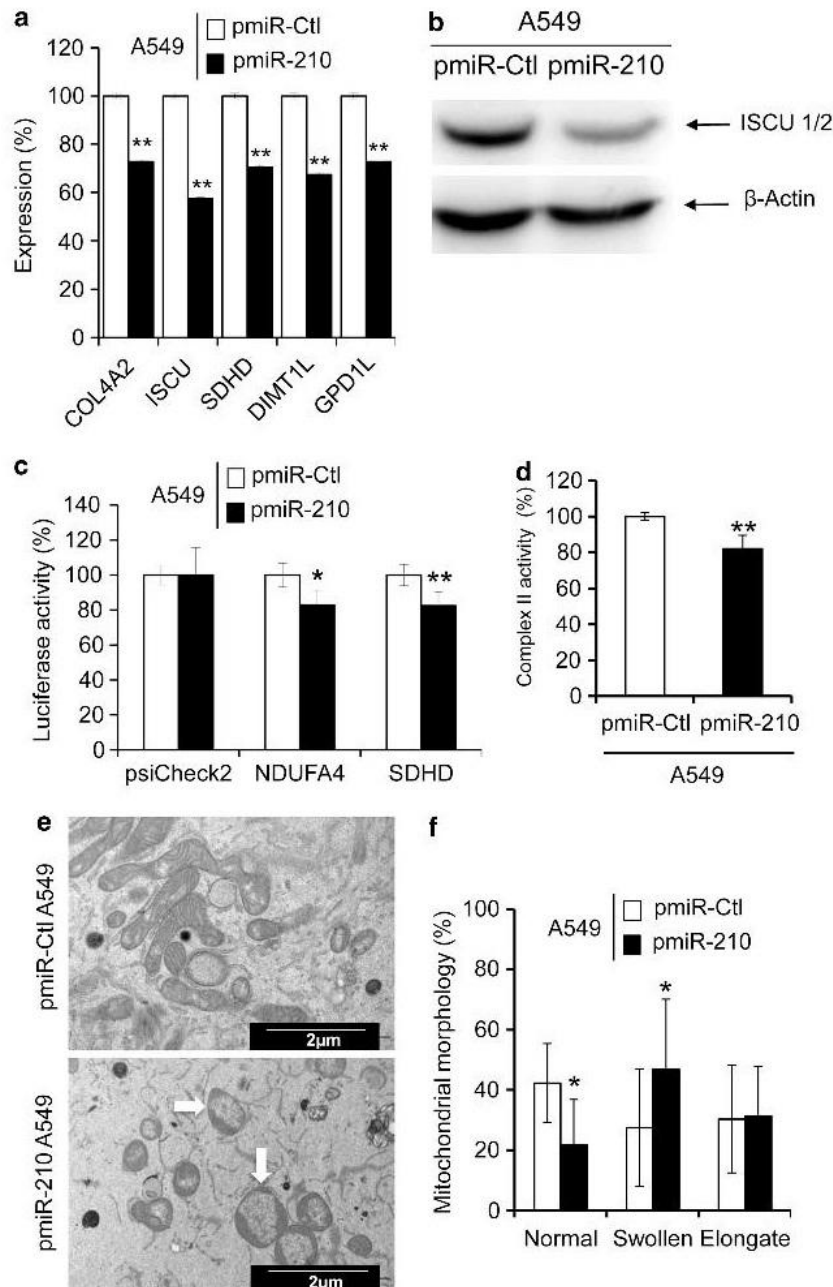


Figure 2 Mitochondrial functions are altered in pmiR-210 A549 cells. (a) Expression levels of five miR-210 targets (predicted and confirmed) were measured by qRT-PCR in pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in triplicate. (b) Western blotting showing downregulation of ISCU1/2 in pmiR-210 cells. Representative blot out of three independent experiments is shown. (c) Effect of miR-210 on NDUFA4 and SDHD was assessed using luciferase reporter assay. NDUFA4 3'-UTR, SDHD 3'-UTR construct or the control construct were transfected into pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells and assayed for luciferase activity. Renilla luciferase values were normalized to Firefly luciferase activity. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in triplicate. (d) Complex II activity assays were performed on pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells 48 h after plating. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in duplicate. (e) Electron micrograph showing morphology of mitochondria in pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells. (f) Quantification of mitochondrial morphology. The quantification was done on thirty cells for each cell line. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$

right panel). Finally, pmiR-210 cells showed greater lactate production compared with pmiR-Ctl cells (Figure 3e), confirming the increase in glycolytic flux.

We next used another NSCLC cell line, H1975, along with HeLa cells stably expressing luciferase under a hypoxia responsive element (HRE) named HeLa-HRE Luc.³⁴ The two

cell lines were infected with pre-miR-210 lentiviral vectors, leading to a stable and moderate expression of mature miR-210 (Supplementary Figure S1a). As expected, miR-210 overexpression led to a decrease in miR-210 sensor luciferase activity and NDUFA4 or SDHD 3'-UTR pSiCheck-2 constructs in H1975 cells, as well as a significant downregulation

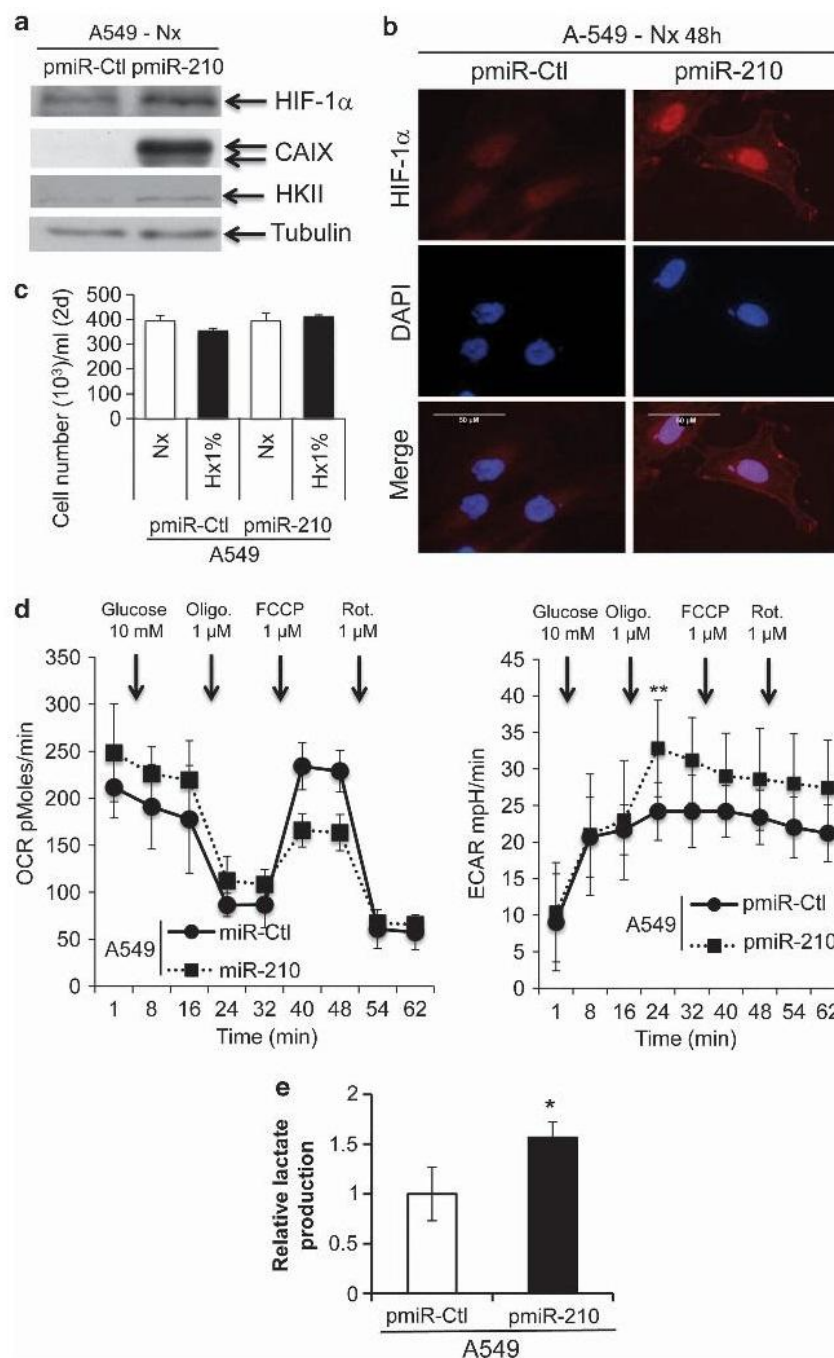


Figure 3 Metabolic characterization of pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells. (a) Immunoblotting of HIF-1 α , CAIX, HKII and tubulin in pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells in normoxia. (b) Immunofluorescence of HIF-1 α in pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells in normoxia; scale bar, 50 μ m. (c) Characterization of the growth of pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells incubated in normoxia (Nx) or in hypoxia 1% O₂ (Hx1%) for 2 days (2d). Mean \pm S.E.M. is representative of two independent experiments carried out in duplicate. (d) OCR (left panel) and ECAR (right panel) were measured in real time in a Seahorse XF bioenergetic assay. A total of 2×10^4 pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells were seeded for 2d. Average OCR and ECAR were calculated from at least four measurements during the treatment of each compound (glucose, oligomycin, FCCP, rotenone) at the concentration as indicated. Mean \pm S.E.M. is representative of six independent experiments carried out in triplicate. ** $P < 0.01$ shows significant difference from the miR-Ctl after addition of oligomycin. (e) After 2d of culture, cells were lysed in assay buffer by sonication. Then, lactate was quantified in cellular extracts. Lactate quantity is expressed in relative lactate production. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in duplicate. * $P < 0.05$ shows significant difference from the miR-Ctl

of ISCU1/2 protein levels in the two cell lines (Supplementary Figures S1b and c). As miR-210 acts on several mitochondrial targets that could mediate apoptosis,²⁸ we next measured caspase-3 activity in the different cell line models

(Supplementary Figures S1d-f). We could detect a moderate but significant induction of caspase-3 in the pmiR-210 population compared with pmiR-Ctl cells for H1975 and HeLa-HRE Luc cell lines, whereas no significant differences

could be detected for A549 cells. However, no significant differences in cell growth and viability could be observed between pmir-210 and pmir-Ctl conditions for the three cell lines (data not shown). Immunofluorescence indicated that HIF-1 was also stabilized in the two additional pmir-210 cell types in normoxia compared with pmir-Ctl cells (Supplementary Figures S2a and b). Moreover, although luciferase activities measured from the two subpopulations of HeLa-HRE Luc were similar in hypoxia, a significantly higher activity was found in pmir-210 cells in normoxia (Supplementary Figure S2c). These data were confirmed by lactate production, with the two pmir-210 cells showing greater lactate production compared with control cells (Supplementary Figure S2d). Overall, these results confirm and extend to other cell lines our previous data,²⁸ showing that miR-210 alone can partially mimic hypoxic conditions.

MiR-210 confers resistance to radiation. We next analyzed the impact of miR-210 expression levels on the sensitivity to radiation. As a control, we first confirmed the protective effect of hypoxia on A549 parental cells. Figure 4a illustrates the fraction of clonogenic survival as a function of radiation dose in A549 wt cells in normoxia and hypoxia 1% O₂ (Hx1%), confirming that hypoxic A549 cells are more radioresistant. We then tested radiosensitivity of pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells in either normoxia or hypoxia (Figure 4b and Supplementary Figure S3a). Interestingly, pmir-210 A549 cells in normoxia exhibited a radioresistance similar to that of pmir-Ctl cells in hypoxia. Moreover, hypoxia was able to increase this resistance. The morphology of the different colonies obtained 7 days after irradiation (Figure 4c) confirmed the protective effect associated with miR-210 expression. Importantly, pmir-210 H1975 as well as pmir-210 HeLa-HRE Luc cells also presented a significant radioresistance in normoxia compared with pmir-Ctl (Supplementary Figures S3b and c).

We next monitored the p53 status between pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells following radiation. We observed a rapid and prolonged induction of p53 expression at both 4 and 8 Gy radiation at the protein level in both pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells (Figure 4d and Supplementary Figure S4). Expression level of p21, a direct target of p53, followed p53 activity after radiation but remained reproducibly at a lower level in pmir-210 A549 cells (Figures 4d and e and Supplementary Figure S5). Consistent with the miR-210-mediated resistance to radiation, caspase-3 activity was 60% lower in pmir-210 A549 cells subjected to 8 Gy than in pmir-Ctl cells (Figures 4d and e). However, analysis of the cell cycle showed no significant differences between pmir-210 and pmir-Ctl A549 cells, either before or after radiation (Figure 4f).

MiR-210 cells rapidly repair double-strand breaks (DSBs) after radiation. We followed the expression of two markers of DSB-induced DNA repair, γ H2AX and tumor suppressor p53-binding protein 1 (53BP1), by immunofluorescence in A549 cells. Neither hypoxia nor overexpression of miR-210 was able to activate the expression of γ H2AX and/or 53BP1 (Supplementary Figure S6). As expected, radiation (8 Gy) induced DSBs as indicated by the expression of

53BP1 at 15 min post radiation in both the pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells (Figure 5a). Total 53BP1 foci numbers were similar (~ 100 foci per nucleus) in both cell types at this time point (Figure 5b). However, after 48 h post radiation we clearly observed a decrease in foci for pmir-210 A549 cells compared with pmir-Ctl cells (5.6 ± 1.2 versus 10.8 ± 3.3 ; Figure 5c). The number of foci and the location of the DSBs merged perfectly between γ H2AX and 53BP1. This difference in the number of foci was also observed at early (18 h, 37.1 ± 3.8 versus 14.5 ± 2.0) and late (72 h, 2.2 ± 0.6 versus 0.8 ± 0.1) time points post radiation (Figure 5d, Supplementary Figures S7 and S8). Counting apoptotic nuclei after staining with DAPI revealed that pmir-210 A549 cells had significantly fewer apoptotic nuclei (7.4%) than pmir-Ctl cells (13.2%; Supplementary Figure S9). Increased mitosis was also found in pmir-210 cells (Figure S7, yellow arrow) after 18 h post radiation. Finally, we investigated whether miR-210 expression could confer resistance to other genotoxic treatments. We tested three compounds used in chemotherapy in several cancers, including NSCLC: (i) bleomycin, which generates DSBs and DNA single-strand breaks, (ii) cisplatin, classified as an alkylating agent and (iii) docetaxel, a spindle poison. We observed that pmir-210 A549 cells ($29.4\% \pm 1.5$) showed an enhanced resistance to bleomycin compared with pmir-Ctl ($20.6\% \pm 2.9$), whereas no differences were observed for cisplatin and docetaxel (Figure 5e and Supplementary Figure S10).

MiR-210 confers radioresistance to cancer cells through HIF-1. We established new stable pmir-210 A549 clones, in which HIF-1 α was knocked down (pmir-210/HIF⁻) using the pTerHIF-1 constructs already described³⁵ (Figure 6a). Surprisingly, we observed no difference in growth between pmir-Ctl, pmir-210 and pmir-210/HIF⁻ in normoxia or hypoxia (Supplementary Figure S11a). We next compared the metabolism of both pmir-210 and pmir-210/HIF⁻ A549 cells by real-time monitoring of OCR and ECAR, following the same protocol described above. The invalidation of HIF-1 α in pmir-210 A549 cells had a dramatic impact on mitochondrial respiration (Figure 6b, top panel). In parallel, the addition of oligomycin had no effect on the glucose-stimulated ECAR, indicating that all of the available glucose is utilized for glycolysis (Figure 6b, bottom panel) and that pmir-210/HIF⁻ A549 cells had lost their ability to use OXPHOS. Radioresistance of pmir-210/HIF⁻ A549 cells was then tested. We observed that pmir-210/HIF⁻ cells were less resistant to radiation than pmir-210, but still slightly more resistant than pmir-Ctl (Figure 6c). We finally explored the effect of modulation of miR-210 and HIF-1 α expression in tumor spheroids containing a natural oxygen gradient *in vitro*³⁶ (Figure 6d). Comparing first the morphology of spheroids, we observed that pmir-Ctl A549 spheroids showed irregular contours unlike the uniform pmir-210 spheroids obtained with the same amount of cells (Supplementary Figure S11a). Although cell growth in 2D did not differ between the different cells, spheroids obtained with pmir-210/HIF⁻ were 10 times smaller than control spheroids owing to a strong defect in cell growth (Supplementary Figure S11b). Moreover, 5 days after radiation (8 Gy), cells in the pmir-210 spheroids survived better than pmir-Ctl spheroids ($7.1\% \pm 3.6$ versus

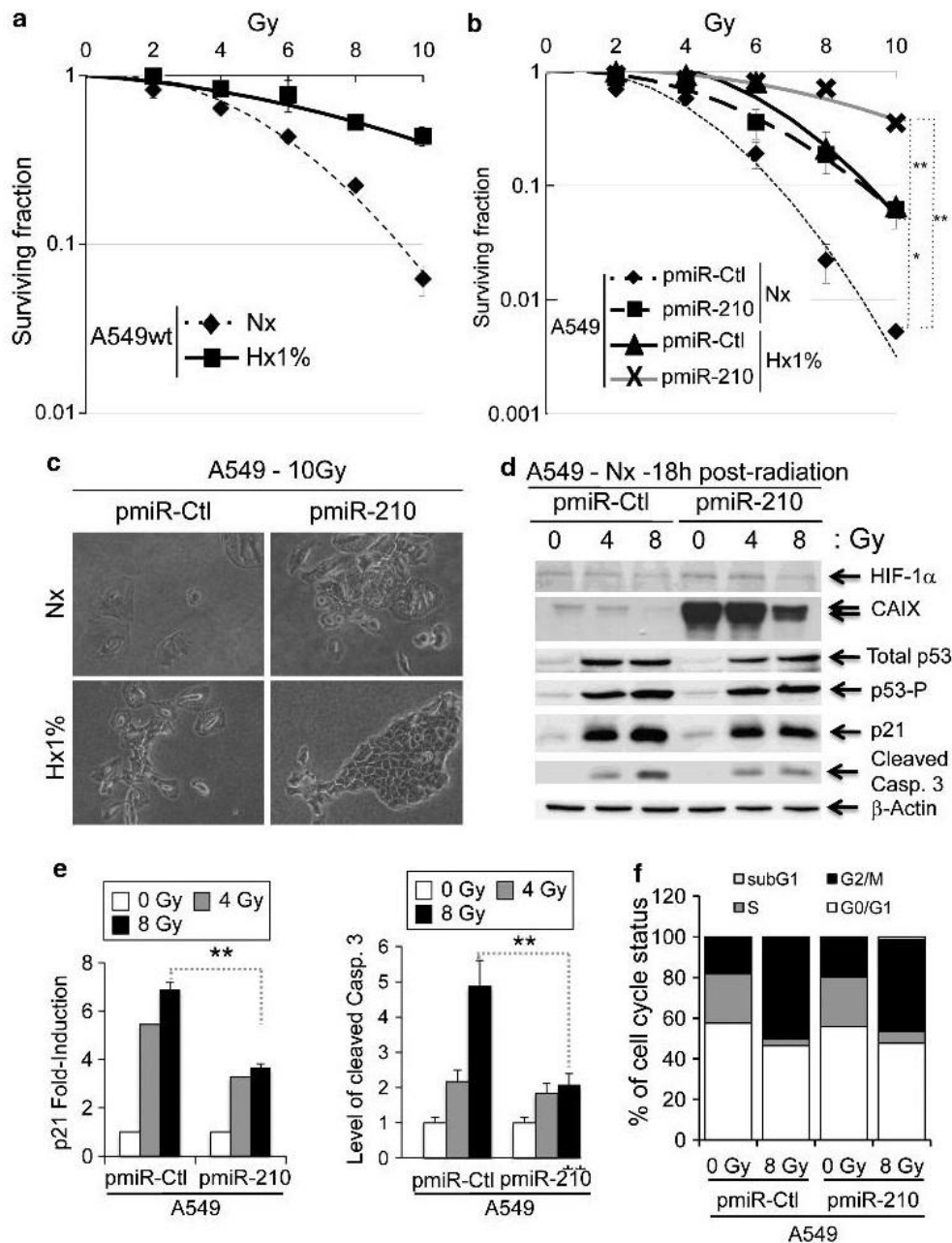


Figure 4 Radioresistance of pmir-210 A549 cells. (a) Radioresistance of wild-type A549 (A549wt) cells cultured for 2 days in normoxia (Nx) and in hypoxia 1% O₂ (Hx1%), and treated with the indicated dose of radiation. Cells were then subjected to a clonogenic cell survival assay. In x axis is the dose of X-radiation. In y axis is the surviving fraction. Mean \pm S.E.M. is representative of two independent experiments carried out in duplicate. (b) Radioresistance of both pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells cultured for 2 days in normoxia (Nx) and hypoxia 1% O₂ (Hx1%). The cells were then subjected to a clonogenic cell survival assay. In x axis is the dose of X-radiation. In y axis is the surviving fraction. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in duplicate for a + b. (c) Cell morphology from microscope images of pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells cultured for 2 days in normoxia (Nx) and hypoxia 1% O₂ (Hx1%), treated with 10 Gy and subject to clonogenic cell survival. (d) Immunoblotting of HIF-1 α , CAIX, total p53, p53-P, p21, cleaved caspase-3 (cleaved Casp.3) and β -actin in pmir-Ctl and pmir-210 A549 cells in normoxia (Nx) 18h after irradiations (0, 4 and 8 Gy). (e) Histograms show the quantification of the p21 and the cleaved caspase-3 bands. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments. ** $P < 0.01$. (f) Eighteen hours after the indicated dose of irradiation, cells were fixed and labeled with propidium iodide for analysis by flow cytometry. Histograms represent the percentage of cells in each phase of the cell cycle (subG1, G0/G1, S and G2/M). Representative results are shown from three independent experiments

27.8% \pm 5.4 cell death, respectively; Figure 6e, left panel). All A549 cells from pmir-210/HIF⁻ spheroids were dead after 5 days. The difference between pmir-210 and pmir-Ctl spheroids was still maintained 10 days after radiation (19.8% \pm 6.7 versus 41.7% \pm 6.5 cell death, respectively; Figure 6e, right panel).

These data indicated that an *in vitro* 3D system, which approximates spatial conditions observed *in vivo*, confirmed the miR-210-mediated radioresistance. Moreover, inactivation of HIF-1 in cells expressing miR-210 significantly reduces their radioresistance, confirming the strong molecular link between miR-210 and HIF-1.

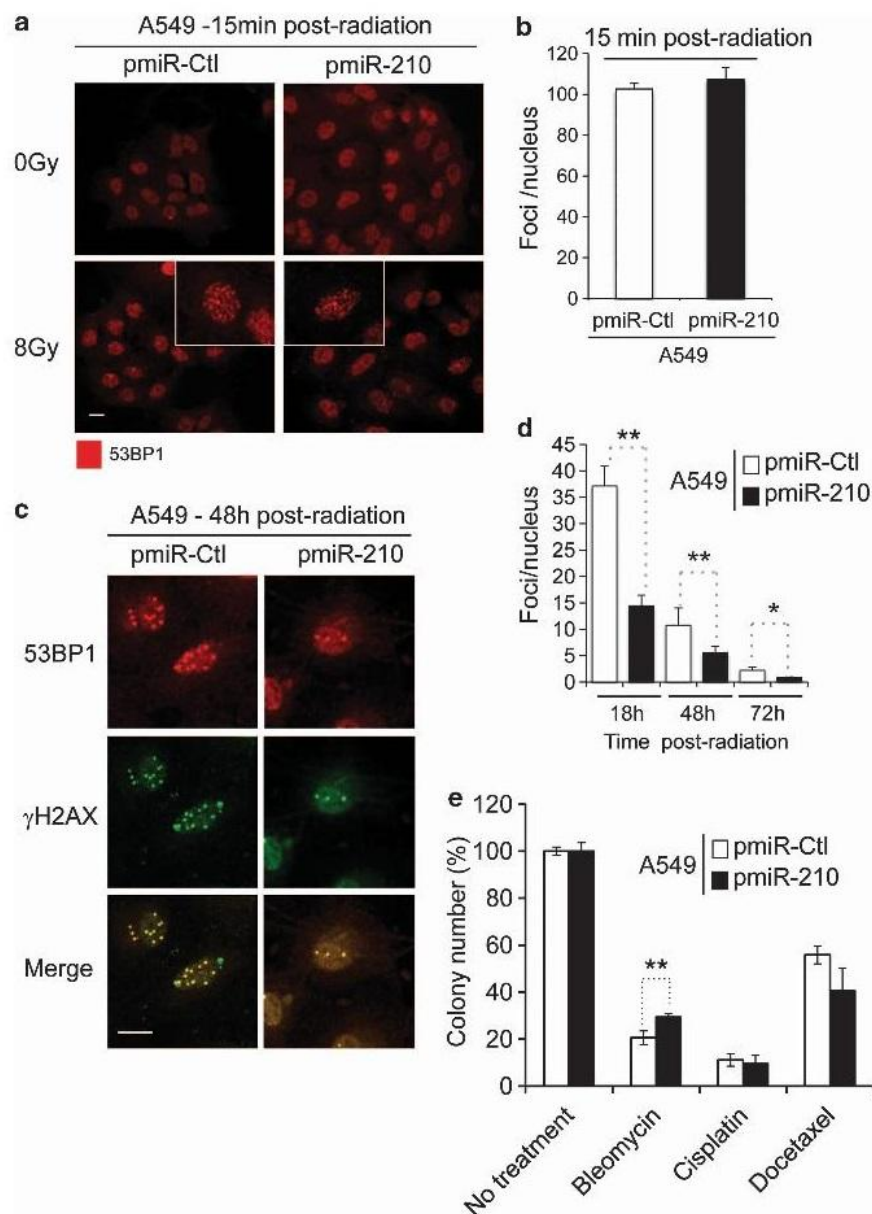


Figure 5 Increased kinetics of DSBs repair after radiation in pmiR-210 A549 cells. (a) Induction of 53BP1 foci in pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells following 0–8 Gy at 15 min; scale bar, 7.3 μ m. (b) Histograms show the quantification of the average foci per nucleus from at least three independent measurements. (c) 53BP1 colocalizes with the canonical DSB marker γ H2AX in pmiR-Ctl and pmiR-210 A549 cells at 48 h following 8 Gy; scale bar, 7.3 μ m. (d) Histograms show the quantification of the foci per nucleus on average from at least three independent measurements in a time-responsive manner (18, 48 and 72 h after irradiations). (e) A549 cells, pmiR-Ctl and pmiR-210 were cultured for 2 days, and at this point, treated with cisplatin (1 μ g/ml) for 24 h or docetaxel (25 nM) for 4 h, or bleomycin for 2 h (10 μ g/ml). Then, cells were trypsinized and plated in triplicate (1000 cells per well in 6-well plates) for clonogenic survival. Cells were allowed to form colonies during 10 days. At this time, they were fixed and stained with crystal violet and counted using ImageJ software. Data represent the average of two independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

Discussion

We show here for the first time that several normoxic cancer cell lines expressing the ‘hypoxamir’ miR-210 exhibited a radioresistance similar to that found in hypoxic control cells. Our data shows that miR-210 stable expression mimics hypoxia-induced metabolic changes (CAIX and hexokinase II (HKII) expression, lactate production) associated with a slight but significant stabilization of HIF-1 α . This information, combined with a strong reduction of radioresistance following HIF-1 silencing, reinforces the central role of HIF-1 in the

resistance to radiotherapy. The molecular mechanism responsible for this radioresistance is not fully understood and is likely mediated by a complex network of miR-210 targets involved in a wide set of biological functions, including cell cycle control, survival, DNA repair and cell metabolism.^{22,23} The precise contribution of these specific pathways in this phenotype is described below.

MiR-210 and cell cycle. Stimulation of cell proliferation may promote HIF-1 stabilization, and we have previously shown

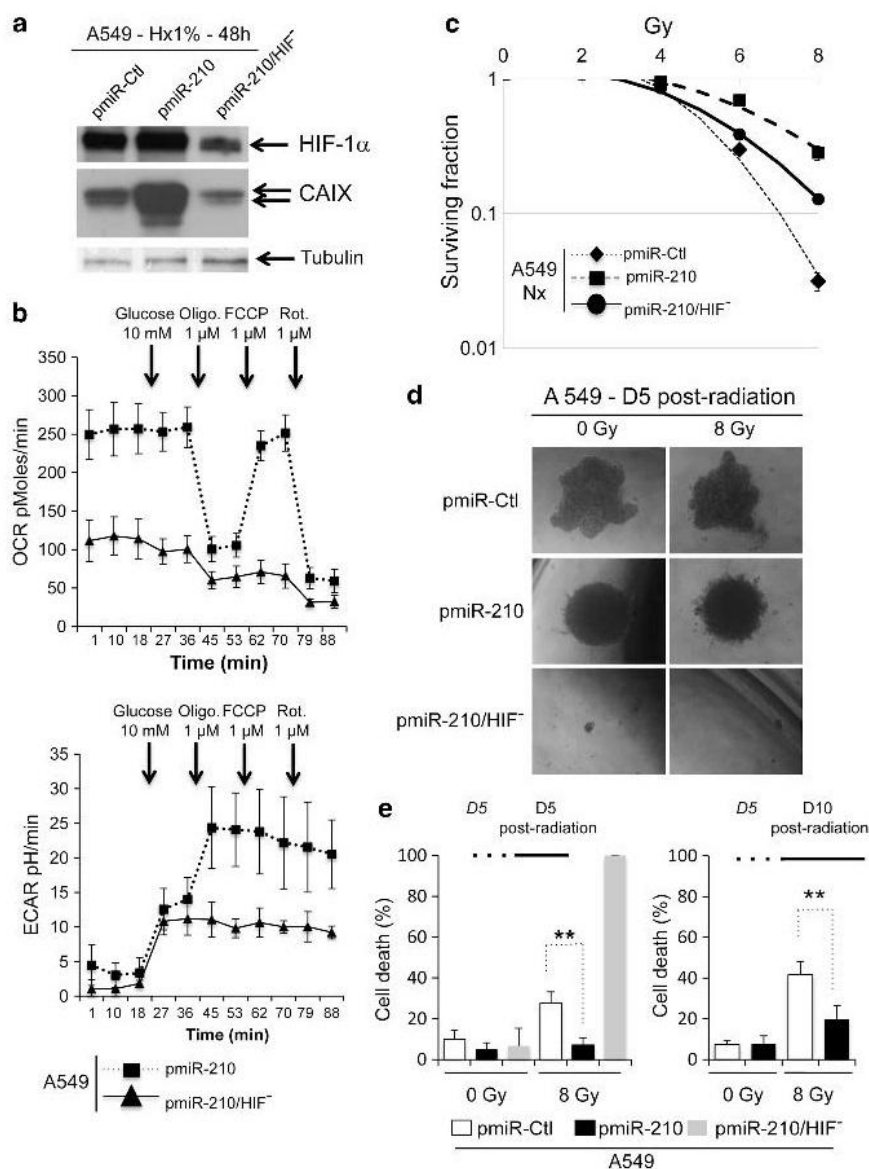


Figure 6 Involvement of HIF-1 α in miR-210 radioresistance. (a) Immunoblot of HIF-1 α , CAIX and tubulin in pmiR-Ctl, pmiR-210 and pmiR-210/HIF⁻ A549 cells in hypoxia 1% O₂ (Hx1%). (b) OCR (top panel) and ECAR (bottom panel) were measured in real time in a Seahorse XF bioenergetic assay. A total of 2×10^4 pmiR-210 and pmiR-210/HIF⁻ A549 cells were seeded for 2 days. Average OCR and ECAR were calculated from at least four measurements during the treatment of each compound (glucose, oligomycin, FCCP, rotenone) at the concentration as indicated. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in triplicate. (c) Radioresistance of both pmiR-210 and pmiR-210/HIF⁻ A549 cells cultured for 2 days in normoxia (Nx). The cells were then subjected to a clonogenic cell survival assay. In x axis is the dose of X-radiation. In y axis is the surviving fraction. Mean \pm S.E.M. is representative of three independent experiments carried out in duplicate. (d and e) A549 cells, pmiR-Ctl, pmiR-210 and pmiR-210/HIF⁻, were cultured as 3D spheroids for 5 days (D5), subjected to 0 or 8 Gy, and then cultured for 5 (D5) or 10 (D10) days. Spheroids were then subjected to accutase dissociation, and individualized live cells and dead cells were counted using Trypan blue. Data represent the average of three independent experiments. ** $P < 0.01$

that a high cell density consumes large amounts of oxygen to reproduce hypoxic conditions.³³ MiR-210 has been previously shown to repress or stimulate cell proliferation, depending on the cellular model. It targets proteins that are crucial for the cell cycle, such as E2F3,^{37,38} FGFR1^{39,40} or HOXA1,⁴⁰ to inhibit cell growth. On the other hand, it also targets the myc-antagonist MNT⁴¹ promoting cell cycle progression in some cancer cells. Lung adenocarcinoma (A549 or H1975) cells stably expressing miR-210 did not show any modulation regarding their proliferation rate and are, therefore, unlikely to create such O₂ local

deprivation. We also focused on the cell cycle, as cells in S-phase are less radiosensitive;⁴² however, we observed no differences between pmiR-210 and pmiR-Ctl in 2D conditions (Figure 4f). This lack of effect on cell cycle may be explained by the fact that miR-210 function has so far been studied within hours or days following transient transfection using relatively high concentration of miRNAs mimics, whereas in our conditions cells have been adapted to a stable and moderate miR-210 concentration. Finally, we also looked at the induction of p53, which is well known to coordinate DNA repair with cell cycle progression and

apoptosis.⁴² Similar expression levels of both total p53 and p53-P were induced in the two cell lines following radiation in a dose-dependent manner (Figures 4d and e), confirming our previous results. Surprisingly, expression of one of the main p53 effectors, the potent cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1, was almost 50% lower after radiation in cells expressing miR-210. Despite this p21 expression level, it is likely that there were sufficient p21 levels in pmiR-210 cells to induce growth arrest as shown in cell cycle analysis (Figure 4f).

MiR-210 and DSB repair. We could clearly demonstrate that miR-210 expression conferred a strong radioresistance to all of the three cell lines tested. Moreover, the number of 53BP1- and γH2AX-associated foci disappeared significantly faster in pmiR-210 A549 cells compared with pmiR-Ctl cells following radiation, suggesting that the process of DSB repair was more efficient in cells expressing miR-210. The source of radioresistance appeared to be specific for DSBs, as cells expressing miR-210 were also able to withstand a cytotoxic antibiotic treatment with bleomycin that generates DSBs. On the contrary, miR-210 has been implicated in the shutdown of DNA repair *via* targeting the enzyme RAD52.⁴³ However, no modulation of RAD52 could be observed in our cellular model, which explains, in part, these conflicting data. Comparative genomic studies between pmiR-210 and pmiR-Ctl A549 cells did not reveal any modulation of a specific gene involved in DSB repair at the RNA level (data not shown). During preparation of this manuscript, Yang *et al.*⁴⁴ reported that stable integration of an antisense sequence against miR-210 (iR-210) suppressed cell viability, induced cell arrest in the G(0)/G(1) phase, increased apoptotic rate and enhanced radiosensitivity in hypoxic human hepatoma. They proposed apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 3 (AIFM3) as a new miR-210 target involved in these processes. Although these results are consistent with our data, no significant expression of AIFM3 was found in our NSCLC cell line model. In contrast, another recent study focusing on prostate cancer has reported the absence of radiosensitization using a miR-210 inhibitor on prostate cancer cells in condition of anoxia, suggesting that miR-210 inhibition may depend on the type of cancer or on the degree and duration of hypoxia.⁴⁵

MiR-210, cell metabolism and radioresistance. MiR-210 expression in normoxia resulted in a glycolysis-dominated metabolism (Figures 3d and e). By reducing the metabolism of mitochondria in normoxia, miR-210 would create a mitochondrial dysfunction that is known to lead to an increase in toxic reactive oxygen species (ROS).²⁵ Adaptation of cells to an increased ROS production may be part of the mechanism that protects cells against radiation exposure. Moreover, it has been shown that lactate, the final product of glycolysis, has an antioxidant effect acting as a scavenger of free radicals.^{46–48} Therefore, an interaction between the increase in ROS production and increased lactate likely contributes to the resistance of the different pmiR-210 cell types analyzed in this study. Interestingly, hypoxia-induced miR-210 remains elevated even after reoxygenation,⁴⁹ suggesting that

miR-210 could sustain inhibition of mitochondria metabolism and HIF1 activation in the presence of oxygen. This mechanism may also occur in tumor cells in which HIF-1α expression is increased *via* hypoxia-independent pathways through transcriptional and/or translational regulation by oncogenes, loss of the tumor suppressor PTEN,⁵⁰ or as suggested recently by systemic elevation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1.^{51,52} It might therefore be conceivable that miR-210 may be a marker of radioresistance in circumstances other than hypoxia.

MiR-210 as a marker of radioresistance? MiR-210 overexpression has been found in numerous tumors,^{40,53–55} including NSCLC.⁵⁶ Whether miR-210 is linked to a poor prognosis and/or a poor response to treatment is not clearly established, although three studies previously reported miR-210 overexpression as a bad prognostic factor in a small cohort of patients with HNSCC,⁵⁷ soft-tissue sarcoma⁵⁸ and breast carcinoma.⁵⁹ Interestingly, although a post-operative radiotherapy was delivered in the cohort of patients with HNSCC,⁵⁷ no clear correlation could be found between miR-210 expression and oncogenic or DNA repair pathway signatures. It would be interesting to analyze in future patient cohorts the impact of miR-210 regarding tumor response after radiotherapy or chemotherapy for clinical outcome, especially in tumors presenting miR-210 overexpression, such as NSCLC.

In summary, we provide evidence that miR-210 can efficiently mediate radioresistance in the NSCLC cell line A549, suggesting that miR-210 is an attractive prognostic/predictive biomarker in this type of cancer. More knowledge is now required regarding the underlying molecular mechanisms, notably through knockdown strategies and *in vivo* models to evaluate whether targeting miR-210 may have potential value as an adjuvant therapy for tumor radiosensitization.

Materials and Methods

Cell culture. The lung adenocarcinoma A549 and H1975 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and grown in Ham's F-12K supplemented with penicillin, streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ air atmosphere. The p3HRE-Aptk-LUC construct was described in Dayan *et al.*³⁴ HeLa cells were cotransfected with p3HRE-Aptk-LUC and pBabepuro. Puromycin-resistant clones were tested in hypoxia for their ability to upregulate LUC activity (HeLa-HRE Luc). A Bug-Box anaerobic workstation (Ruskin Technology, Bridgend, UK) set at 1% oxygen, 94% nitrogen and 5% carbon dioxide was used for hypoxic conditions.

Generation of stable miR-Ctl, miR-210 and miR-210/HIF-1⁻ cell lines. A lentiviral miR-210 expression vector that expresses ~400-base pre-miR-210 and empty lentiviral vector were purchased from System Biosciences (SBI, Mountain View, CA, USA). A pre-miR (ce-miR-67) from *Caenorhabditis elegans* was cloned into the lentiviral vector and used as a control. Virus production and cell transduction were performed following the manufacturer's protocol. The resulting pmiR-Ctl and pmiR-210 cells that stably overexpress miR-210 were selected by puromycin (1 μg/ml).

Several pmiR-210/HIF-1⁻ A549 clones were obtained using two independent sequences of shRNA against HIF-1α.³⁵ We selected one clone for each sequence, based on the decreased mRNA level of HIF-1α (>95% – data not shown) and the expression of HIF-1α and CAIX in hypoxia compared with the same conditions in pmiR-210 cells (Figure 6a). As both clones were then tested under the same conditions and gave the same results, we only show the results from one clone (sequence pTerHIF-1bis).

qRT-PCR analysis. miR-210 expression was evaluated using the TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) as specified in their protocol. Expression of target genes was assessed using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems). Real-time qPCR was performed using TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems) and a Lightcycler 480 (Roche, Meylan, France) real-time PCR machine. All reactions were performed in triplicate. Expression levels of miRNA and mRNAs were evaluated using comparative CT method ($2^{-\Delta CT}$). Transcript levels of RNU44 (for microRNA assay), β -actin and ubiquitin C (for gene expression assay) were used as endogenous control.

Luciferase assay. Transfection of 50 ng psiCHECK-2 constructs (Sensor 210 described in Yang *et al.*²⁹ and NDUFA4 and SDHD described in Puissegur *et al.*²⁸) was carried out in 96-well plates with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Saint Aubin, France). The medium was replaced 8 h after transfection with fresh medium containing 10% FCS and supplemented with penicillin and streptomycin. At 48 h after transfection, firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo luciferase assay (Promega, Charbonnières, France). For experiments with HeLa-HRE Luc cells, cells were plated in six-well plates and incubated in 21% O₂ or 1% O₂ for 24 h. Cells were then lysed, firefly luciferase activity was measured and were normalized to total protein contents.

Microarrays

Expression microarrays. SurePrint G3 Human Gene Expression 8 × 60 K Microarray from Agilent Technology (Loveland, CO, USA) were used. RNA were labeled and hybridized following the manufacturer's instructions. Two biological replicates were performed for each comparison. The experimental data and microarray design have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under series GSE43622.

Statistical analysis. Normalization was performed using the Limma package available from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Intra- and interslide normalization was performed using the Print Tip Loess and the quantile methods, respectively. Means of ratios from all comparisons were calculated and *B*-test analysis was performed. Differentially expressed genes were selected using a *B*-value > 0.

Biological theme analysis. Data from expression microarrays were analyzed for enrichment in biological themes (Gene Ontology molecular function and biological process) using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>) and Mediant (http://www.microarray.fr:8080/merge/index).

miR-210 targets analysis was performed with MiRnTop (available at <http://www.microarray.fr:8080/miRnTop/index>) as previously described.³⁰

Transmission electronic microscopy. Cells were fixed *in situ* with 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at room temperature for at least 1 h and then conserved at 4 °C. Samples were rinsed in the same buffer and then postfixed with 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at room temperature to enhance the staining of cytoplasmic membranes. Cells were rinsed with distilled water and embedded in epoxy resin. Embedded samples were then processed for thin sectioning and observed with a JEM1400 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) equipped with a Morada CCD camera (Olympus SIS, Rungis, France).

Western blot analysis. Cells were lysed in 1.5 × Laemmli buffer and the protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay. Forty microgram of protein of whole-cell extracts was resolved by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked in 5% non-fat milk in TN buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) and incubated in the presence of the primary and then secondary antibodies in 5% non-fat milk in TN buffer. After washing in TN buffer containing 0.1% TWEEN-20 and then in TN buffer, immunoreactive bands were visualized with the ECL system (Amersham Biosciences, Orsay, France).

Antibodies. Anti-HIF-1 α (antiserum 2087) was produced and characterized in our laboratory as described previously.³⁴ Rabbit polyclonal antibodies to HKII, p53 and phospho-p53 (ser15), 53BP1 and p21 were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA), Novus Biologicals (Cambridge, UK) and Santa Cruz

(Heidelberg, Germany), respectively. Mouse antibodies to CAIX and ISCU1/2 were purchased from Bayer HealthCare Co. (Berlin, Germany) and Novus Biologicals, respectively. Membranes were also blotted with the mouse monoclonal antibodies to tubulin (Santa Cruz) and β -actin (Cell Signaling) as loading controls.

Complex II activity. Complex II activity was assessed using Complex II Enzyme Activity Microplate Assay Kit from Mitosciences (Abcam, Paris, France) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed and complex II from lysate was immobilized in the well by a capture antibody. Succinate, 2,6-dichloroindophenol and ubiquinone 2 were added to the well, and the decrease in absorbance at 600 nm was measured.

Caspase-3/7 assay. The activation of executioner caspase-3 and -7 in all cell types was determined using the Caspase-Glo 3/7 Assay kit (Promega), according to manufacturer's instructions. Cells were plated in triplicate in 96-well plates and treated as described above. Luminescence was quantified after 1 h of incubation with the caspase substrate.

Lactate quantification. Lactate quantification was done on cellular extracts using a Lactate Assay Kit (Biovision, Milpitas, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Assessment of the cell cycle by flow cytometry. Eighteen hours after radiations, cells were washed, fixed in 70% ethanol and left for a minimum of 24 h at -20 °C. Next, cells were washed 2 × in phosphate buffered saline (PBS) and incubated in PBS buffer containing 50 μ g/ml of propidium iodide and 50 μ g/ml RNase A for 15 min at 37 °C. Cell distribution across the different phases of the cell cycle was analyzed with LSR Fortessa cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

3D cell culture, radiation and cell death. To grow spheroids, 5000 pmiR-Ctl, pmiR-210 and pmiR-210/HIF1 - A549 cells were seeded in 20 μ l drops of F-12 media supplemented with 10% fetal bovine serum. After 5 days, spheroids were irradiated (0 and 8 Gy) as described below. Spheroids were then collected and transferred to polyhema-coated 96-well plates containing the same media for 5 days. Spheroids were dissociated in Accutase (Life Technologies, Saint Aubin, France), and live and dead cells were counted (Trypan blue uptake).

Cell radiations. Radiation of tumor cells was performed in 60-mm dishes. Cells were irradiated 100 cm from the source with a bolus of 1.1 cm (under dishes; water equivalent of 2 cm). Low-energy photons were used (6 MV), delivered by a clinical device (PRIMUS, Siemens, Concord, CA, USA) with a 40 × 40 cm posterior field. The debit of the PRIMUS was 300-monitor units/min and 2 Gy corresponded to 93 monitor units (18.6 s).

Cloning efficiency. One thousand or 5000 cells were plated in normoxic or hypoxic conditions in 60-mm dishes or flasks, subsequently irradiated at day 2 (2, 4, 6, 8 and 10 Gy), then immediately trypsinized and plated in triplicate for clonogenic survival. Cells were allowed to form colonies during 7 days. At this time, they were stained with Giemsa and counted using ImageJ software. For chemotherapy sensitivity, 400 000 cells were plated in 25 cm² flask and cultivated for 2 days. At this point, cells were treated for 24 h with cisplatin or 4 h with docetaxel or for 2 h with bleomycin, then immediately trypsinized and plated in triplicate (1000 cells per well in 6-well plates) for clonogenic survival. Cells were allowed to form colonies during 10 days. At this time, they were fixed and stained with crystal violet and counted using ImageJ software.

Confocal microscopy. Cells were grown on glass coverslips and then fixed in 3.3% paraformaldehyde for 30 min at RT and permeabilized with 0.2% Triton-X-100 for 5 min. Cells were blocked with PBS containing 0.2% gelatin and 2% bovine serum albumin for 30 min at RT, and incubated with anti-rabbit HIF-1 α (described in the Immunoblotting section) and/or antimouse CAIX (Bayer), or antirabbit 53BP1 (Novus Biologicals) and anti-mouse γ H2AX (Abcam) antibodies in PBS for 3 h at RT. After washing, cells were incubated in the presence of a biotinylated antimouse secondary antibody conjugated to Alexa 594 (Invitrogen, Saint Aubin, France) (1:400) or antirabbit secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Amersham Biosciences, Munich, Germany) (1:400) for 1 h at RT. After washing, coverslips were mounted in Cytofluor (Amersham Biosciences), detection of the confocal images by fluorescence was performed with a Leica (Leica Microsystem,

Zurich, Switzerland) TCS-SP1 microscope, and images were taken using a Nikon Coolpix 990 digital camera (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Respirometry and extracellular acidification. Cellular OCR and ECAR data were obtained using a Seahorse XF96 extracellular flux analyzer from Seahorse Bioscience (North Billerica, MA, USA). Experiments were performed according to the manufacturer's instructions. Protein standardization was performed after each experiment, with no noticeable differences in protein concentration and cell type.

Statistical analysis. All values are represented as the mean \pm S.D. of the indicated number of replicates (n). Significant differences were based on the Student's t -test and the Wilcoxon rank sum test.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Pascale Bertrand for helpful discussion and suggestions. We acknowledge the excellent support of the Nice-Sophia Antipolis Functional Genomics Platform and of the 'Centre Commun de Microscopie Appliquée' from the University of Nice-Sophia-Antipolis. We thank Nicolas Pons and Sandra Schäfer (IPMC) for excellent technical assistance. We thank Thomas Maurin and Eric Lai for providing us with miR-210 sensor construct. This work was supported by CNRS, INSERM, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, Projet Libre SF102010201798 to BM), Canceropole PACA, French National Research Agency (ANR), Ligue Nationale Contre le Cancer (JP, NM), the Centre Antoine Lacassagne, European Community (MICROENVIMET, FP7-HEALTH-F2-2008-201279 to PB, BM and METOXIA to JP, NM). SG is a recipient of a post-doctoral fellowship from the 'Ville de Nice'.

- Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; **26**: 638–648.
- Palic B, Skarsgard LD. Reduced oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 1984; **100**: 328–339.
- Majumdar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010; **40**: 294–309.
- Harada H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J Radiat Res* 2011; **52**: 545–556.
- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; **60**: 4010–4015.
- Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E *et al.* The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003; **22**: 3213–3220.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; **59**: 5830–5835.
- Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004; **5**: 429–441.
- Zhang X, Kon T, Wang H, Li F, Huang Q, Rabbari ZN *et al.* Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1 α . *Cancer Res* 2004; **64**: 8139–8142.
- Harada H, Itasaka S, Zhu Y, Zeng L, Xie X, Morinibu A *et al.* Treatment regimen determines whether an HIF-1 inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy. *Br J Cancer* 2009; **100**: 747–757.
- Bertero T, Grosso S, Robbe-Sermesant K, Lebrigand K, Henaoui IS, Puissegur MP *et al.* 'Seed-Milarity' confers to hsa-miR-210 and hsa-miR-147b similar functional activity. *PLoS One* 2012; **7**: e44919.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; **75**: 843–854.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 259–269.
- White NM, Fatouhi E, Metias M, Jung K, Stephan C, Yousef GM. Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**: 75–84.
- Farazi TA, Spitzer JL, Morozov P, Tuschli T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011; **223**: 102–115.
- Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; **10**: 704–714.
- Ortholan C, Puissegur MP, Ilie M, Barbry P, Mari B, Hofman P. MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem* 2009; **16**: 1047–1061.
- Arora H, Qureshi R, Jin S, Park AK, Park WY. miR-9 and let-7g enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NF κ B1. *Exp Mol Med* 2011; **43**: 298–304.
- Oh JS, Kim JJ, Byun JY, Kim IA. Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; **76**: 5–8.
- Salim H, Akbar NS, Zong D, Vaculova AH, Lewensohn R, Moshfegh A *et al.* miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence. *Br J Cancer* 2012; **107**: 1361–1373.
- Yan D, Ng WL, Zhang X, Wang P, Zhang Z, Mo YY *et al.* Targeting DNA-PKcs and ATM with miR-101 sensitizes tumors to radiation. *PLoS One* 2010; **5**: e11397.
- Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 2010; **9**: 1072–1083.
- Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK. miR-210: the master hypoxamir. *Microcirculation* 2012; **19**: 215–223.
- Noman MZ, Buart S, Romero P, Ketari S, Janji B, Mari B *et al.* Hypoxia-inducible miR-210 regulates the susceptibility of tumor cells to lysis by cytotoxic T cells. *Cancer Res* 2012; **72**: 4629–4641.
- Chan SY, Zhang YY, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab* 2009; **10**: 273–284.
- Favaro E, Ramachandran A, McCormick R, Gee H, Blancher C, Crosby M *et al.* MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS One* 2010; **5**: e10345.
- Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 2010; **29**: 4362–4368.
- Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K *et al.* miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 465–478.
- Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R *et al.* Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 15163–15168.
- Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P. MiR-210: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 2010; **26**: 3131–3132.
- Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, Pescatori M, Brioschi M, Kulshreshtha R *et al.* An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *J Biol Chem* 2009; **284**: 35134–35143.
- Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 α stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol* 2011; **31**: 2696–2706.
- Dayan F, Bilton RL, Laferriere J, Trotter E, Roux D, Pouyssegur J *et al.* Activation of HIF-1 α in exponentially growing cells via hypoxic stimulation is independent of the Akt/mTOR pathway. *J Cell Physiol* 2009; **218**: 167–174.
- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 α . *Cancer Res* 2006; **66**: 3688–3698.
- Bilton R, Mazure N, Trotter E, Hattab M, Dery MA, Richard DE *et al.* Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and is not induced by hypoxia or HIF. *J Biol Chem* 2005; **280**: 31132–31140.
- Pelletier J, Dayan F, Durivault J, Ilc K, Pecou E, Pouyssegur J *et al.* The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis. *Oncogene* 2012; **31**: 2989–3001.
- Biswas S, Roy S, Banerjee J, Hussain SR, Khanna S, Meenakshisundaram G *et al.* Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 6976–6981.
- Giannakakis A, Sandatzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K *et al.* miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2008; **7**: 255–264.
- Tsuchiya S, Fujiwara T, Sato F, Shimada Y, Tanaka E, Sakai Y *et al.* MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1). *J Biol Chem* 2011; **286**: 420–428.
- Huang X, Ding L, Benneth KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK *et al.* Hypoxia-inducible miR-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell* 2009; **35**: 856–867.
- Zhang Z, Sun H, Dai H, Walsh RM, Imakura M, Schelter J *et al.* MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle* 2009; **8**: 2756–2768.
- Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59**: 928–942.
- Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer Res* 2009; **69**: 1221–1229.
- Yang W, Sun T, Cao J, Liu F, Tian Y, Zhu W. Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro. *Exp Cell Res* 2012; **318**: 944–954.
- Quero L, Dubois L, Lieuwes NG, Hennequin C, Lambin P. miR-210 as a marker of chronic hypoxia, but not a therapeutic target in prostate cancer. *Radiother Oncol* 2011; **101**: 203–208.

46. Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 2000; **89**: 169–175.
47. Sattler UG, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C *et al*. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 2010; **94**: 102–109.
48. Sattler UG, Mueller-Klieser W. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol* 2009; **85**: 963–971.
49. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G *et al*. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 2008; **283**: 15878–15883.
50. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 705–713.
51. Schelter F, Halbgewachs B, Baumler P, Neu C, Goriach A, Schrotzlmair F *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Clin Exp Metastasis* 2011; **28**: 91–99.
52. Cui H, Grosso S, Schelter F, Mari B, Kruger A. On the pro-metastatic stress response to cancer therapies: evidence for a positive co-operation between TIMP-1, HIF-1alpha, and miR-210. *Front Pharmacol* 2012; **3**: 134.
53. Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE *et al*. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol* 2009; **20**: 539–550.
54. Satzger I, Meier A, Alter M, Kapp A, Gutzmer R. Parameters predicting prognosis in melanoma sentinel nodes. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 3588–3590.
55. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 2010; **126**: 73–80.
56. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M *et al*. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; **9**: 189–198.
57. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G *et al*. hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer* 2010; **116**: 2148–2158.
58. Greither T, Wurl P, Grochola L, Bond G, Bache M, Kappler M *et al*. Expression of microRNA 210 associates with poor survival and age of tumor onset of soft-tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 2012; **130**: 1230–1235.
59. Hong L, Yang J, Han Y, Lu Q, Cao J, Syed L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Gene* 2012; **507**: 135–138.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License**. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

RESUME

Rôle des protéines de régulation du pH intracellulaire et du métabolisme énergétique dans les carcinomes du sein triple négatif

Les cancers se caractérisent par une prolifération cellulaire incontrôlée, avec pour certains cancers, à évolution rapide, un métabolisme glycolytique exacerbé (effet Warburg). Il en résulte une surexpression de protéines d'import du glucose comme GLUT1 mais aussi d'autres protéines assurant le contrôle du pH intracellulaire (pHi) par l'export efficace des acides carbonique et lactique. Ce rôle majeur, requis pour le maintien énergétique de la cellule est assuré et magnifié dans les conditions hypoxiques par l'induction des anhydrases carboniques (CA9 et 12), le symporteur H⁺/ lactate MCT4 (MonoCarboxylate Transporteur) et MCT1 induit par c-Myc. Les études récentes ont établi que le ciblage de ces régulateurs de pHi ont un effet cytostatique sur des modèles de cancer du pancréas et colon xénogreffés chez la souris (Parks et al., Nature Reviews Cancer 2013). Cette approche n'a été pas ou peu explorée dans le cancer du sein.

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité toutes causes confondues et comprend 3 sous-groupes: 70% dépendent de récepteurs nucléaires à l'estrogène et à la progestérone, 15% de l'expression membranaire de Her-2 (c-erbB2), et 15% qui n'expriment aucun de ces marqueurs, appelés "triple négatif" (TNEG). Ce sous groupe ne répond donc ni aux hormonothérapies, ni aux traitement anti-Her-2 et a par conséquent le pronostic le plus péjoratif. Ils se démarquent des autres sous groupes par une fixation intense et constante du ¹⁸Fluoro-déoxy-glucose au PET-scanner, suggérant une addiction au glucose.

Un précédent travail réalisé par le Dr Trastour (thèse 2011) a permis de montrer dans une cohorte de 653 patientes (dont 62 TNEG) que les cancers TNEG expriment bien plus les protéines du métabolisme glycolytique (MCT4, MCT1, GLUT-1, CAIX) que les autres cancers du sein. Nous avons ensuite montré une corrélation de l'expression de ces marqueurs, en particulier de MCT4, avec la survenue de métastases et des décès dans une cohorte plus large de 160 patientes TNEG. Par la suite nous avons testé l'efficacité anti-tumorale *in vitro* d'inhibiteurs ciblant les protéines impliquées dans le métabolisme glycolytique comme MCT1 et le complexe I mitochondrial de la chaîne respiratoire (phenformine). La délétion de MCT4 a été obtenue par la technique des Zinc Finger Nucléases (ZFN). L'efficacité anti-proliférative était maximale lors du ciblage commun de ces 3 protéines dans une lignée de cancer du sein TNEG (Hs578t). Cette étude montre donc pour la première fois le caractère très glycolytique des tumeurs TNEG et propose quelques cibles potentielles dont l'efficacité sera testée prochainement dans des modèles murins de xénogreffes transplantées directement à partir des tumeurs des patientes. Cette approche sera facilitée par le développement par AstraZeneca d'un inhibiteur de MCT4

Métabolisme hypoxique, complément d'études

Nous avons confirmé que le ciblage du métabolisme glycolytique permet d'augmenter la radiosensibilité de xénogreffes tumorales d'une lignée de cancer du colon (Doyen J et al, Frontiers in Oncology, 2013), avec démonstration sous-jacente que l'acidose est un nouveau facteur radiosensibilisant. Enfin, dans le cancer du poumon, nous avons également montré *in vitro* que le ciblage de l'hypoxamiR miR-210 permettait de radiosensibiliser drastiquement ce sous-type de cancer (Grosso S*, Doyen J* et al, Cell Death Disease 2013; *co-premiers auteurs).

L'ensemble de ces études montre que la dérégulation des protéines impliquées dans le métabolisme hypoxique et glycolytique joue un rôle dans l'agressivité tumorale et pourrait être exploité en thérapie anticancéreuse.